

HSV/AAV-HYBRIDAMPLIKONVEKTOREN ZUR STABILEN TRANSDUKTION HUMANER ZELLEN

HEIDI KLUCKEN-SWYEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel
und
der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Betreuerin: PD Dr. Dagmar Dilloo

HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren zur stabilen Transduktion humaner Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Heidi Klucken-Swyen
Tierärztin aus Duisburg

Gießen, 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Thiel
PD Dr. Dagmar Dilloo

Tag der Disputation: 05.07.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Gentherapie	1
1.2	Somatische Gentherapie.....	1
1.3	Methoden des Gentransfers.....	3
1.4	Virale Gentransfermethoden	3
1.4.1	Adeno-assoziierte Viren (AAV) und auf AAV basierende Vektoren.....	5
1.4.2	Herpes simplex Viren (HSV) und herpesvirale Vektoren.....	8
1.4.3	HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren	12
1.5	Hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen als Zielzellen für die Gentherapie	14
1.5.1	Gentransfer in humane hämatopoetische Stammzellen.....	14
1.5.2	Gentransfer in humane mesenchymale Stammzellen.....	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	16
2	MATERIAL.....	17
2.1	Chemikalien und Lösungen	17
2.2	Enzyme und Proteine	17
2.2.1	Restriktionsendonukleasen.....	17
2.2.2	Weitere Enzyme	17
2.3	Puffer und Lösungen.....	17
2.3.1	Puffer für die Plasmidpräparation	17
2.3.2	Puffer für die Southern Blot-Analyse	18
2.3.3	Sonstige Puffer	18
2.4	Zusätze für die Transfektion	18
2.5	Nukleinsäuren	19
2.5.1	Bakterielles artifizielles Chromosom (BAC)	19
2.5.2	Amplikonplasmide	19
2.5.2.1	HSV-1-Standardamplikonplasmid.....	19

INHALTSVERZEICHNIS

2.5.2.2	HSV/AAV-Hybridamplikonplasmid	19
2.5.3	Weitere Plasmide	20
2.5.4	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	20
2.5.4.1	Sequenzen der spezifischen Primer für β -Aktin	20
2.5.4.2	Sequenzen der spezifischen Primer für die Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren A, B und C	20
2.5.4.3	Sequenzen der spezifischen Primer für GFP	20
2.5.4.4	Sequenzen der spezifischen Primer für AAVS1	20
2.5.4.5	Sequenzen der spezifischen Primer für Rep	21
2.5.5	DNA-Fragmentlängenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese	21
2.6	Gebrauchsfertige Reagenziensysteme	21
2.7	Bakterienstämme	21
2.8	Medien zur Anzucht der Bakterienstämme	22
2.9	Zellen	22
2.9.1	Verpackungszelllinie	22
2.9.2	Adhärent wachsende Zelllinien	22
2.9.3	Lymphohämatopoetische Zelllinien	22
2.9.4	Primäre Zellen	22
2.10	Kulturmedien und Zusätze	23
3	METHODEN	24
3.1	Molekularbiologische Techniken	24
3.1.1	Transformation von Bakterien	24
3.1.2	Herstellung von Glycerindauerkulturen	24
3.1.3	Herstellung von CsCl-gesättigtem Butanol	24
3.2	DNA-Methoden	25
3.2.1	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	25
3.2.2	Isolierung von Nukleinsäuren	25
3.2.2.1	Plasmidpräparation von fHSV Δ pac Δ ICP27 Δ KN (BAC)	25
3.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	28
3.2.2.3	Isolierung von DNA	28

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.3	Polymerasekettenreaktion	29
3.2.4	Analyse von DNA in Agarosegelen	29
3.2.5	Southern Blot-Analyse	30
3.2.5.1	DNA-Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese	30
3.2.5.2	Transfer von DNA	30
3.2.5.3	Herstellung von DNA-Sonden	31
3.2.5.4	Markierung von DNA-Sonden	32
3.2.5.5	Prähybridisierung und Hybridisierung	32
3.2.5.6	Waschen der Membran und Detektion	33
3.3	RNA-Methoden	33
3.3.1	Isolierung von RNA	33
3.3.2	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	33
3.3.2.1	RT-PCR mit hämatopoetischen CD34+-Stammzellen	34
3.3.2.2	RT-PCR mit 293-Zellen	35
3.4	Zellkulturtechniken	36
3.4.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	36
3.4.2	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	37
3.5	Herstellung der helfervirusfreien HSV-1-Amplikonvektoren und der helfervirusfreien HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren	38
3.5.1	Transfektion der 2-2-Verpackungszelllinie	38
3.5.2	Virusernte	39
3.6	Transduktion verschiedener Zelllinien und primärer Zellen	40
3.6.1	Transduktion der 293-Zellen	40
3.6.2	Transduktion lymphohämatopoetischer Zelllinien	40
3.6.3	Transduktion hämatopoetischer CD34+-Stammzellen	40
3.6.4	Transduktion mesenchymaler Stammzellen	40
3.7	Durchflusszytometrie	41
3.7.1	FACS-Analyse	42
3.7.2	Antikörper- und Propidiumiodid-Färbung	42
3.8	Fluoreszenzmikroskopie	43

3.9	Einzelzellklonierung	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Herstellung von helfervirusfreien HSV-1-Amplikonvektoren.....	44
4.1.1	Vergleich der Ausbeute an BAC-Plasmid-supercoil- und BAC-Plasmid-relaxed-circle-Form	44
4.1.2	Vergleich der Transduktionseffizienz nach Transfektion mit der BAC-Plasmid-supercoil- und der BAC-Plasmid-relaxed-circle-Form.....	45
4.1.3	Einfluss des PLUS TM -Reagenz bei der Herstellung der HSV-1- Amplikonvektoren	48
4.2	Optimierung der einzusetzenden Vektormenge für eine Transduktion von lymphohämatopoetischen Zelllinien	49
4.3	Vergleich der Transduktionseffizienz und der Toxizität zwischen dem HSV-1-Standardamplikonvektor und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor.....	52
4.4	Transduktion lymphohämatopoetischer Zelllinien	54
4.4.1	Vergleich der Transduktionseffizienz und der Toxizität 24 h nach der Transduktion.....	54
4.4.2	Vergleich der Transgenexpression und der Toxizität im Zeitverlauf.....	56
4.5	Semiquantitativer Nachweis der AAV-Rep-Expression nach Transduktion mit HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren	60
4.6	Analyse einer Fremdgen-Integration in der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293	62
4.6.1	Einzelzellklonierung von 293-Zellen	62
4.6.2	Nachweis einer stabilen GFP-Expression in den 293-Einzelzellklonen	64
4.6.3	Bestimmung des Verlaufs der GFP-Expression von zwei stabilen 293-Einzelzellklonen über einen Zeitraum von bis zu 43 Wochen nach Klonierung.....	67
4.6.4	Nachweis des Transgens GFP in den 293-Einzelzellklonen durch PCR	68
4.6.5	Nachweis einer spezifischen Integration in die AAVS1-site des humanen Chromosoms 19 durch eine Southern Blot-Analyse	69
4.6.6	Zusammenfassung der PCR- und Southern Blot-Ergebnisse.....	77
4.7	Untersuchung einer stabilen Transgenexpression in humanen hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen	77
4.7.1	Transduktion humaner hämatopoetischer CD34+-Stammzellen.....	77
4.7.1.1	Nachweis von Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren.....	78

INHALTSVERZEICHNIS

4.7.1.2	Bestimmung der Transduktionseffizienz 24 h nach der Transduktion	79
4.7.1.3	Vergleich der Transgenexpression und der Toxizität im Zeitverlauf	80
4.7.2	Transduktion humaner mesenchymaler Stammzellen	84
4.7.2.1	Bestimmung der Transduktionseffizienz und der Toxizität 24 h nach der Transduktion	84
4.7.2.2	Vergleich der Transgenexpression und der Toxizität im Zeitverlauf	85
5	DISKUSSION	87
6	ZUSAMMENFASSUNG	101
7	SUMMARY	103
8	LITERATURVERZEICHNIS	105
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	118

1 EINLEITUNG

1.1 Gentherapie

Die Behandlung von Erbkrankheiten bzw. Gendefekten mit Hilfe von Genen (Gentherapie) wird in naher Zukunft vor allem von der Entwicklung sicherer und leicht anwendbarer Gentransfermethoden abhängig sein. Es muss daher eine Möglichkeit entwickelt werden, eine neue genetische Information transient (temporär) oder permanent in eine Körperzelle einzuschleusen, um einen genetischen Defekt zu kompensieren oder eine Zusatzinformation in die Zielzelle einzubringen. Voraussetzungen für eine erfolgreiche Gentherapie sind 1. die Identifizierung eines defekten sowie eines entsprechenden therapeutischen Gens (Transgen), 2. das Vorhandensein eines geeigneten Vektors für die hocheffiziente Transduktion der Zielzelle mit diesem Transgen und 3. die regulierte Expression dieses Transgens im Hinblick auf die Expressionshöhe und -dauer.

1.2 Somatische Gentherapie

Die somatische Gentherapie ist ein vergleichsweise junger Zweig der Medizin, der mit der Zielsetzung entwickelt wurde, vererbte oder erworbene genetisch bedingte Krankheiten durch die Einschleusung von transgenem Material in die erkrankten Körperzellen zu heilen. Dabei werden nur somatische Zellen, also Körperzellen wie zum Beispiel Muskelzellen oder Blutzellen, die nicht an der Reproduktion eines Individuums beteiligt sind, gentherapeutisch verändert. Da keine embryonalen Zellen verändert werden, beschränken sich die Auswirkungen der somatischen Gentherapie beim Einsatz der sicherheitsmodifizierten Vektoren nur auf das behandelte Individuum und werden nicht auf die Nachkommen übertragen.

Je nach Zielsetzung wird zwischen der korrektiven und der modulierenden Gentherapie unterschieden. Während bei der korrektiven Gentherapie die normale Funktion deletierter oder mutierter Gene durch das Einbringen des entsprechenden funktionierenden Gens dauerhaft wiederhergestellt wird, wird bei der modulierenden Gentherapie eine zeitweilige (transiente) Funktionsänderung der Zielzelle angestrebt.

Neben dieser Unterscheidung wird die somatische Gentherapie in die *ex vivo*- (*in vitro*-) und die *in vivo*-Behandlung eingeteilt. Bei der *in vivo*-Behandlung wird das genetische Material direkt in die von der Krankheit betroffenen Körperzellen wie zum Beispiel Lungenzellen oder Leberzellen appliziert. Die Applikation erfolgt entweder über einen lokalen Gentransfer, wobei das genetische Material direkt ins betroffene Gewebe injiziert wird oder über einen systemischen Gentransfer, bei dem das genetische Material ins Blut infundiert wird und durch den Blutkreislauf die Zielzellen erreicht. Bei der *in vitro*-Methode werden, wie in Abb. 1 gezeigt, die Zielzellen wie zum Beispiel Lymphozyten, hämatopoetische Stammzellen oder Leberzellen zunächst aus dem Organismus isoliert, *in vitro* mit dem gewünschten Gen modifiziert und anschließend wieder in den Organismus reinfundiert. Vor der Rückführung in den Körper werden die Vektoren, die Zielzellen, die Transduktionseffizienz in den Zielzellen, die Transgenexpression und die genetische Integration durch Screening-Untersuchungen überprüft. Da die *in vitro*-Gentransfermethoden zur Zeit besser kontrollierbar sind als die zur Verfügung stehenden *in vivo*-Methoden, wird der Gentransfer in den meisten Fällen *in vitro* durchgeführt. Die Expression des Transgens der *in vitro* transfizierten Zellen wird nach Rückführung in den Körper jedoch häufig relativ schnell herunterreguliert, so dass nur ein transienter gentherapeutischer Erfolg erreicht wird.

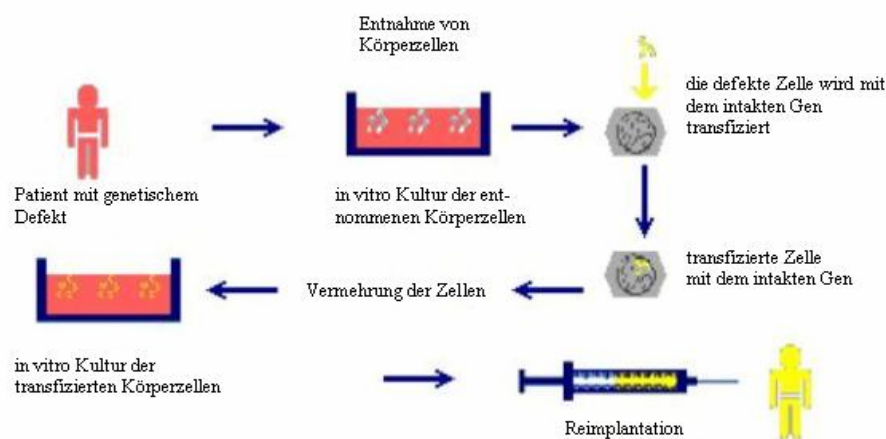


Abb. 1: *In vitro*-Verfahren somatischer Gentherapie. Dem Patienten werden Körperzellen entnommen, *in vitro* vermehrt und gentechnisch verändert. Die Zellen, die jetzt die vorher fehlerhaften Funktionen erfüllen, werden dem Patienten injiziert oder reimplantiert. (www.stmugv.bayern.de/de/gentech/anwendun/therap.htm).

1.3 Methoden des Gentransfers

Sowohl bei der *in vitro*- als auch bei der *in vivo*-Gentherapie wird das genetische Material entweder in virale Vehikel (Vektoren) verpackt, welche auch die Promotoren für die Expression des Transgens enthalten, oder als nichtviraler Vektor, zum Beispiel als „nackte“ DNA (Plasmide/Liposomen), über CaCl_2 , Lipofectamin oder Elektroporation in die Zelle gebracht. Bei menschlichen (und anderen Säuger-) Zellen werden häufiger virale Vektoren verwendet.

1.4 Virale Gentransfermethoden

Viren haben während der Evolution sehr effiziente Strategien entwickelt, ihr Erbmateriale in Wirtszellen einzuschleusen, dort ins Genom einzubauen und den Metabolismus des Wirtes so zu manipulieren, dass ihre eigene Replikation gesichert ist. Diese Eigenschaften haben die Entwicklung von Viren als Vehikel für die Einführung von Fremd-DNA in tierische und menschliche Zellen gefördert.

Viren sind obligate Parasiten und für ihre eigene Vermehrung in der Regel auf die „Vermehrungsmaschinerie“ der infizierten Zelle angewiesen. Um die Vermehrung der infizierten Zelle nicht zu gefährden, werden die Viren für die Gentherapie molekularbiologisch verändert. Typischerweise werden Virusgene entfernt oder zerstört, die zur Vermehrung des Virus benötigt werden. In die vermehrungsunfähigen Viren wird das zu übertragende Gen eingebracht. Es entsteht ein rekombinanter Vektor, der als Transportvehikel benutzt werden kann.

Für den Gentransfer stehen eine Reihe viraler Vektorsysteme zur Verfügung. Virale Vektoren, die bereits in der Klinik eingesetzt wurden, basieren auf Herpes simplex Viren (HSV), adeno-assoziierten Viren (AAV, Parvoviren), Adenoviren, Retroviren und Pockenviren. Bei den nichtviralen Systemen wurde die „nackte“ DNA (Plasmide/Liposomen) getestet. In Tab. 1 sind die unterschiedlichen Eigenschaften sowie die Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden des Gentransfers zusammengefasst (Verma and Somia, 1997; Smith, 1995; Glorioso et al., 1995; Lozier et al., 1997; Gaetano et al., 1999).

EINLEITUNG

Vektor	Herpes-simplex-Viren	Adeno-assoziierte Viren (AAV, Parvoviren)	Retroviren	Adenoviren	Pockenviren (Poxviridae)	“nackte” DNA (Plasmide ^a / Liposomen)
Größe des Genoms	bis 50 kb ^b	bis 4,7 kb	bis 7,5 kb	bis 30 kb	bis 25 kb	unbegrenzt
Genom	doppelsträngige (ds) DNA	einzelsträngige DNA	RNA	ds DNA	ds DNA	DNA
Integration in das menschliche Genom	nein	ja, teilweise Chromosom 19 „Locus 19q 13qter“	ja ^c	nein	nein	nein (selten ja)
Transduktions-effizienz	mäßig	variabel	gut	gut	gut	gering
Zellteilung für Transduzierbarkeit	nicht erforderlich	nicht erforderlich	nicht erforderlich bei Lentivirusabkömmlingen, erforderlich bei Oncovirusabkömmlingen	nicht erforderlich	nicht erforderlich	nicht erforderlich
Genexpression	transient	stabil/transient	stabil	transient	transient	meist transient
Vorteile	Möglichkeit der Infektion neuronaler Zellen	relativ hohe Transduktions-effizienz ohne starke Immunantwort	stabile Genexpression	relativ hohe Transduktion	besonders geeignet als rekombinierte Vakzine	sicher und preiswert
Nachteile	zytotoxisch, Herstellung des Vektors kompliziert	Herstellung des Vektors kompliziert, hauptsächlich Transduktion epithelialer Zellen	Insertions-mutagenese	hauptsächlich Transduktion epithelialer Zellen, häufig Immunantworten, nicht für Blutzellen geeignet	zytotoxisch	niedrige Effizienz

^a: Plasmide sind sich autonom vermehrende „Minichromosomen“.

^b: kb = Kilobasen (1000 Basen); ein menschliches Gen hat im Durchschnitt 3 kb.

^c: Das Genom des Menschen enthält eine Vielzahl retroviraler Sequenzen, die als HERVs (humane endogene Retroviren) bezeichnet werden. Schätzungen zufolge sind zwischen 0,6 bis 1% des menschlichen Genoms retroviralen Ursprungs.

Tab. 1: Vektoren für die Gentherapie. Die Eigenschaften sowie die Vor- und Nachteile des viralen und nichtviralen Gentransfers sind aufgeführt.

In klinischen Studien werden häufig retrovirale Vektoren verwendet (Morgan and Blaese, 1999, Romano et al., 1999). Der große Nachteil der Retroviren ist die unspezifische Integration, die zu einer Insertionsmutagenese führen kann (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Studien weisen darauf hin, dass bevorzugt aktive Gene als Ziel für die Integration dienen (Schroder et al., 2002; Wu et al., 2003). Häufig finden Integrationen nahe dem Start von Transkriptionseinheiten statt. Auch genetische Steuerungssignale können bei einer solchen Integration geschädigt werden. Körpereigene Gene, die an der Entstehung von Krebs beteiligt sind, können durch das Einfügen therapeutischer Gene in ihrer Umgebung aktiviert oder die Expression von Tumorsuppressor-Genen inaktiviert werden. Die Zellen werden dann beispielsweise zu erhöhter Teilungsaktivität und damit zum Krebswachstum angeregt. Das Auftreten einer Insertionsmutagenese ist von vielen Einflussgrößen abhängig, wie von der Proliferation der Zielzellen und der eingesetzten Virusmenge bei der Transduktion der Zielzellen, aber wahrscheinlich auch von der zugrundeliegenden Erkrankung bzw. dem eingeschleusten Transgen.

So erkrankten im Jahr 2002 zum Beispiel zwei von elf behandelten SCID (severe combined immune deficiency, schwere kombinierte Immunschwäche)-Kindern nach der Transplantation retroviral transduzierter blutbildender Stammzellen an Leukämie, aufgrund der Insertionsmutagenese, die nach der gentherapeutischen Behandlung auftrat (Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

1.4.1 Adeno-assoziierte Viren (AAV) und auf AAV basierende Vektoren

Unter den Vektoren, die eine stabile Integration des Transgens ermöglichen, ist der Wildtyp des adeno-assoziierten Virus der einzige Vektor, der eine Integration an einer definierten Stelle des humanen Genoms gewährleistet (Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991). Da AAV außerdem die Fähigkeit haben, auch sich nicht teilende Zellen zu infizieren, sind sie schon immer ein attraktiver Kandidat für die gentherapeutische Vektorentwicklung gewesen.

Der Wildtyp der AAV gehört zur Familie der Parvoviren und konnte bisher noch nicht mit Erkrankungen des Menschen in Zusammenhang gebracht werden (Berns and Giraud,

1996). Das Genom der AAV hat eine Größe von 4,7 kb und besteht aus einer Einzelstrang-DNA, die von den sogenannten „inverted terminal repeats“ (ITRs) flankiert wird. Das AAV- Genom verschlüsselt nur drei Kapsidproteine (cap) und vier sich überlappende Regulatorproteine (Rep78, -68, -52 und -40) (Muzyczka and Berns, 2001). Die ortsspezifische Integration tritt durch eine Deletion/Insertion von 100 Basenpaaren an dem „Rep-bindenden Element (RBE)“ in Erscheinung, welches in der AAVS1-site auf dem q-Arm des humanen Chromosoms 19 (19q 13.3-qter) liegt (Linden et al., 1996; Yang et al., 1997; Young and Samulski, 2001), und wird durch eine Komplexbildung zwischen Rep78 und Rep68, den AAV-ITRs und AAVS1 vermittelt (Miao et al., 1998; Ponnazhagan et al., 1997; Yang et al., 1997). Es wird zwischen dem RBE im p5-Promotor (RBE_{p5}), das dem Rep-Gen vorgeschaltet ist, und dem RBE im ITR (RBE_{ITR}) unterschieden, wobei die Rep-bedingte Integration über das RBE_{ITR} effektiver und spezifischer ist als über das RBE_{p5} (Feng et al., 2006). Philpott et al. (Philpott et al., 2002; Philpott et al., 2004) zeigten, dass die Anwesenheit des p5-Promotors (p5IEE (Integration Effizienz Element)) in *cis* für eine Rep-abhängige ortsspezifische Integration in die AAVS1-site des Chromosoms 19 ausreicht. Während bei Anwesenheit von Rep sowohl spezifische als auch unspezifische Integrationen möglich sind, werden die von den ITRs flankierten Sequenzen ohne Anwesenheit von Rep nur unspezifisch in verschiedene Chromosomen des humanen Genoms integriert (Kearns et al., 1996; Miller et al., 2002; Miller et al., 2005). Die Integrationsrate, die man ohne Rep beobachtet, ist dabei variabel und je nach Zelllinie verschieden. Sie kann von 1% (Russell and Hirata, 1998) bis zu 80% (McLaughlin et al., 1988) betragen. Der Nachteil der Rep-unabhängigen Integration ist das vorwiegende Auftreten dieser Integrationen in aktiven Genen (Nakai et al., 2003). An den unspezifischen Integrationsstellen werden außerdem häufig chromosomale Deletionen beobachtet, die zu einem Verlust von Genfunktionen führen (Miller et al., 2002). Der Nachteil der Rep-abhängigen ortsspezifischen Integration ist die Rep-bedingte Zytotoxizität. Rep78 besitzt eine hohe antiproliferative Aktivität, da die Zielzellen durch die Expression von AAV-Rep78+ Rep68 in verschiedenen Phasen des Zellteilungs-Zyklus arretiert werden (Saudan et al., 2000). Zusätzlich bewirkt die Expression von AAV-Rep78 in infizierten Zellen die

Einleitung der Apoptose (programmierter Zelltod), indem die Kaspase 3-Aktivität induziert wird (Schmidt et al., 2000).

Es gibt Hinweise darauf, dass AAV sowohl in die DNA von sich teilenden als auch in die DNA von sich nicht teilenden Zellen integrieren können, wobei die Frequenz in sich nicht teilenden Zellen deutlich niedriger ist (Russell et al., 1994). Wie in Abb. 2 dargestellt, konnten in verschiedenen Zelllinien bisher mehrere Integrationsstellen in die AAVS1-site des humanen Chromosoms 19 dokumentiert werden. Der grau hinterlegte Bereich stellt den DNA-Abschnitt der AAVS1-site auf dem Chromosom 19 dar, in dem bisher die meisten Integrationen unabhängig von der Zelllinie gezeigt werden konnten.

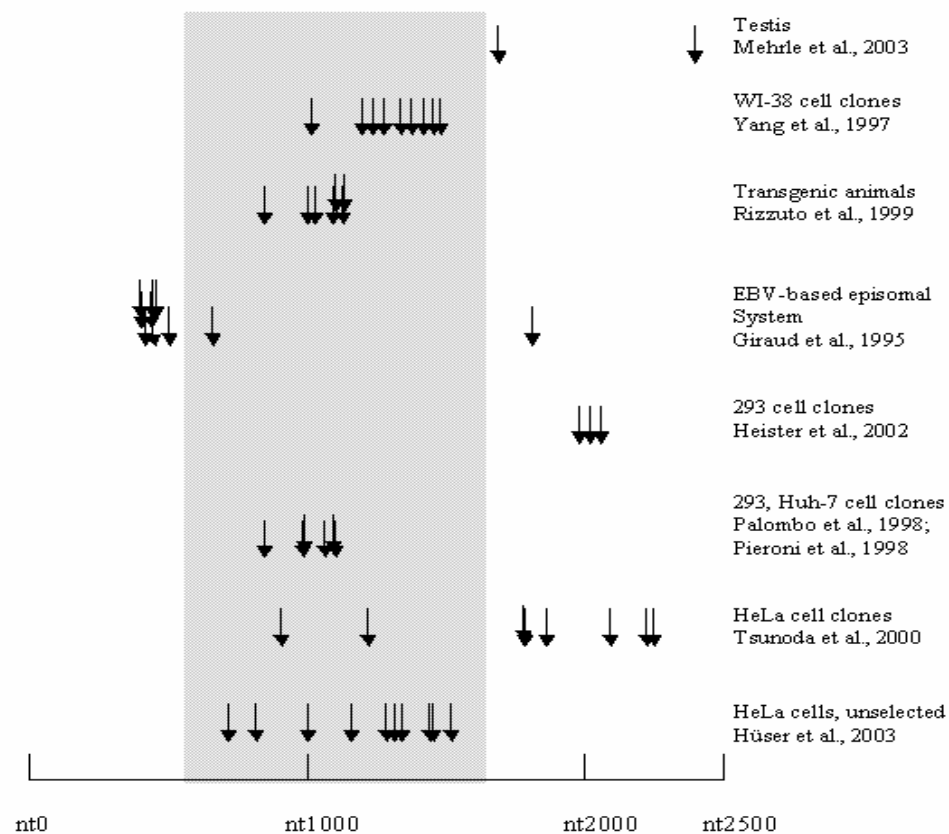


Abb. 2: Integrationsstellen in die AAVS1-site des humanen Chromosoms 19 in verschiedenen Zelllinien. Jeder Pfeil steht für eine nachgewiesene Integrationsstelle in der jeweils rechts daneben stehenden Zelllinie. Der grau unterlegte Bereich stellt den DNA-Abschnitt der AAVS1-site dar, in dem bisher die meisten Integrationen unabhängig von der Zelllinie gezeigt werden konnten. Die entsprechenden Publikationen sind nebenstehend aufgeführt.

1.4.2 Herpes simplex Viren (HSV) und herpesvirale Vektoren

Herpes simplex Viren-Typ 1 (HSV-1) sind im Wesentlichen pantropisch und infizieren sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende Zellen. Dies ermöglicht die Infektion verschiedener Wirtszellen, wie zum Beispiel leukämischer Blasten (Dilloo et al., 1997), postmitotischer Hepatozyten (Fraefel et al., 1997) oder Myozyten (Wang et al., 2002). Bei HSV-1 liegt eine episomale Lokalisation des Vektorgenoms in der Zielzelle vor. Es findet keine Integration in das Genom der Zielzelle statt, wodurch die Gefahr der Insertionsmutagenese, wie sie zum Beispiel bei den retroviralen Vektorsystemen diskutiert wird, nicht gegeben ist. Das HSV-1-Genom kodiert für mehr als 75 Gene, von denen 38 nicht-essentiell für die Virusreplikation sind (Ward and Roizman, 1994). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, große Teile des Genoms (150 kb) durch Fremd-DNA zu ersetzen, was den Transfer von einem oder mehreren therapeutischen Genen, wie er zum Beispiel im Rahmen der Gensatztherapie erforderlich sein kann, ermöglicht (Wang et al., 2002).

Die Besonderheit des HSV-Systems bei der DNA-Replikation ist der sogenannte „rollende Replikationsmechanismus“ (Abb. 3), der die Einschleusung vieler Kopien des genetischen Materials in die Zielzellen durch die Viruspartikel ermöglicht, so dass auch bei hohen Zellteilungsraten viele transgentragende Plasmide (Abb.4) an die Tochterzellen weitergegeben werden können. Aufgrund der multiplen episomalen Partikel kann somit auch ohne Integration des Transgens ins Genom der Wirtszelle eine länger andauernde Transgenexpression erreicht werden.

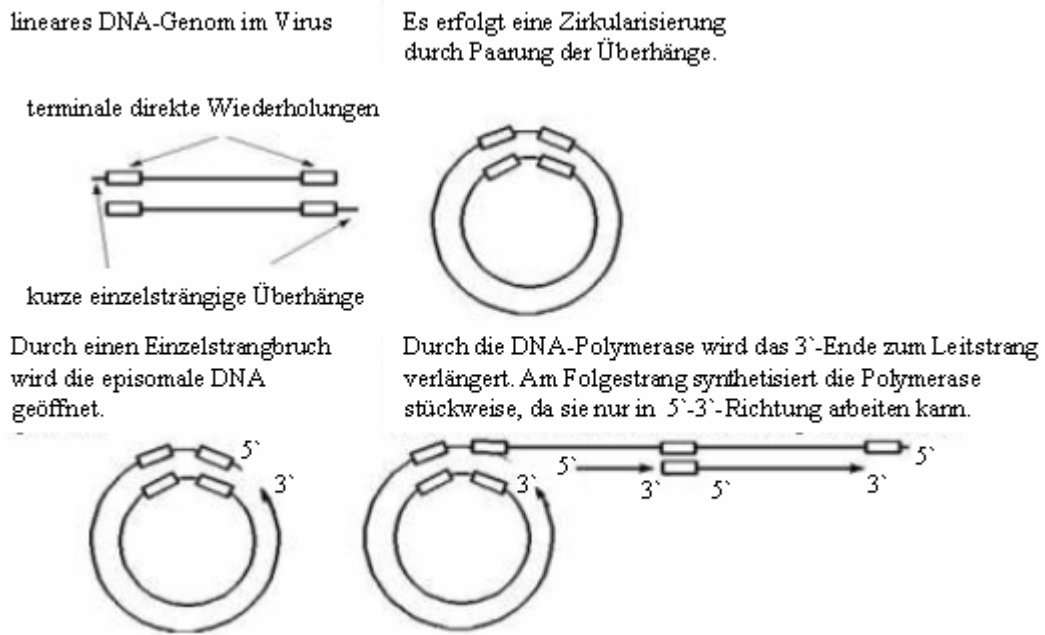


Abb. 3: Rollender Replikationsmechanismus. Zur Vermeidung von Lücken bei der DNA-Replikation wird ein langer Strang Doppelstrang (ds)-DNA gebildet, der aus vielen aneinander gebundenen Kopien der ursprünglichen zirkulären DNA besteht. Diese sogenannten Konkatemere werden anschließend enzymatisch in einzelne Kopien geschnitten (www.vu-wien.ac.at/i123/SPEZVIR/HERPESGEN1.HTML).

Gegenwärtig sind zwei verschiedene Arten von auf HSV-basierenden Vektoren verfügbar: (1) rekombinante HSV-Vektoren, bei denen einzelne Virusgene durch Transgene ersetzt werden, und (2) HSV-Amplikonvektoren (Abb. 4), die auf einem bakteriellen Plasmid basieren, das neben dem Transgen zwei nicht kodierende HSV-1-Sequenzen, den Replikationsursprung *ori_s* und das DNA-Verpackungssignal *pac* beinhaltet. Sowohl bei den rekombinanten HSV-Vektoren als auch bei den HSV-Amplikonvektoren wird die Replikation des Virus durch die Deletion von einem oder mehreren Genen, welche für die Verpackung der Viruspartikel essentiell sind, verhindert.

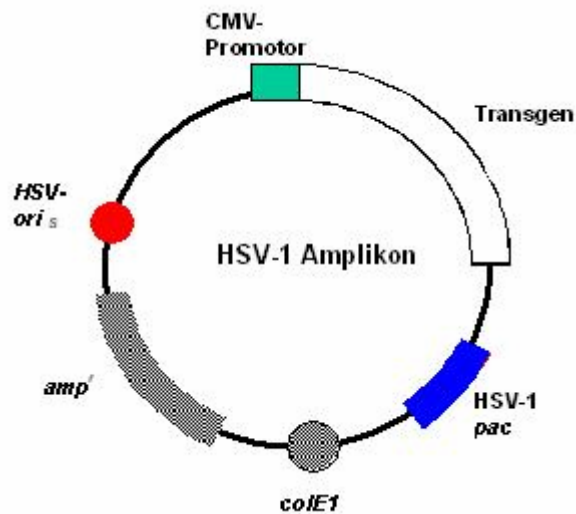


Abb. 4: Schematische Darstellung des HSV-Amplikonvektors. Er besteht aus drei genetischen Elementen: (i) Zwei HSV-1-Sequenzen, dem Replikationsursprung (*ori_S*) und dem Verpackungssignal (*pac*), die zur Replikation und Verpackung des Plasmids in Vektoren erforderlich sind; (ii) einer Transgenkassette mit dem vorgeschalteten CMV-Promotor; und (iii) bakteriellen Sequenzen wie dem Replikationsursprung (*colE1*) und einer Antibiotikaresistenz (*amp^r*), welche die Propagation des Plasmids in *E. coli*-Bakterien ermöglichen.

Die Vektorpartikel, die multiple Konkatemere der Plasmid-DNA enthalten, was zur Bezeichnung „Amplikon“ führte, entstehen durch die Interaktion eines Amplikonplasmides mit HSV-1-Helferfunktionen (Spaete and Frenkel, 1982). Für die Verpackung der Vektoren wurden ursprünglich replikationsdefekte HSV-1-Helferviren verwendet, um die nötigen Helferfunktionen bereitzustellen, die die Vermehrung der DNA und somit die Produktion der Vektoren gewährleisten (helfervirus-abhängige HSV-Amplikonvektoren). Dabei wird das Amplikonplasmid in Verpackungszellen transfiziert, die dann mit den Helferviren infiziert werden. Nachteil dieses Systems ist die unvermeidbare Koexistenz von Helferviren in der Vektorpräparation, die stark toxisch auf die Wirtszelle wirken. Eine wesentliche Verbesserung der Vektorpräparation gelang durch die Klonierung des großen HSV-1-Genoms als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) (helfervirus-unabhängige HSV- Amplikonvektoren (Saeki et al., 1998; Stavropoulos and Strathdee, 1998)). Durch die Klonierung des großen HSV-1-Genoms als BAC (Saeki et al., 1998), welches durch die Deletion des HSV-Verpackungssignals und des essentiellen Gens IE 2 (immediate early protein 2) nicht zur eigenständigen Vermehrung befähigt ist, entsteht ein Konstrukt,

welches alle erforderlichen HSV-1-Proteine in *trans* bereitstellt, die die Vermehrung der DNA und somit die Produktion der Vektoren sicherstellen.

Wie in Abb. 5 dargestellt, wird für eine Herstellung von helfervirusfreien Amplikonstocks eine sogenannte Produktions-Zelllinie mit dem bakteriellen artifiziellen Chromosom (BAC) (Suter et al., 1999), dem Plasmid pEBH ICP27, welches das im BAC-Plasmid deletierte essentielle Gen IE 2 liefert, und dem das Transgen tragenden Plasmid ko-transfiziert (Saeki et al., 1998). Somit wird die Verpackung von Amplikonvektoren ohne die ansonsten unvermeidbare Koexistenz von Helferviren in der Vektorpräparation ermöglicht und die vektorbedingte Zytotoxizität deutlich reduziert.

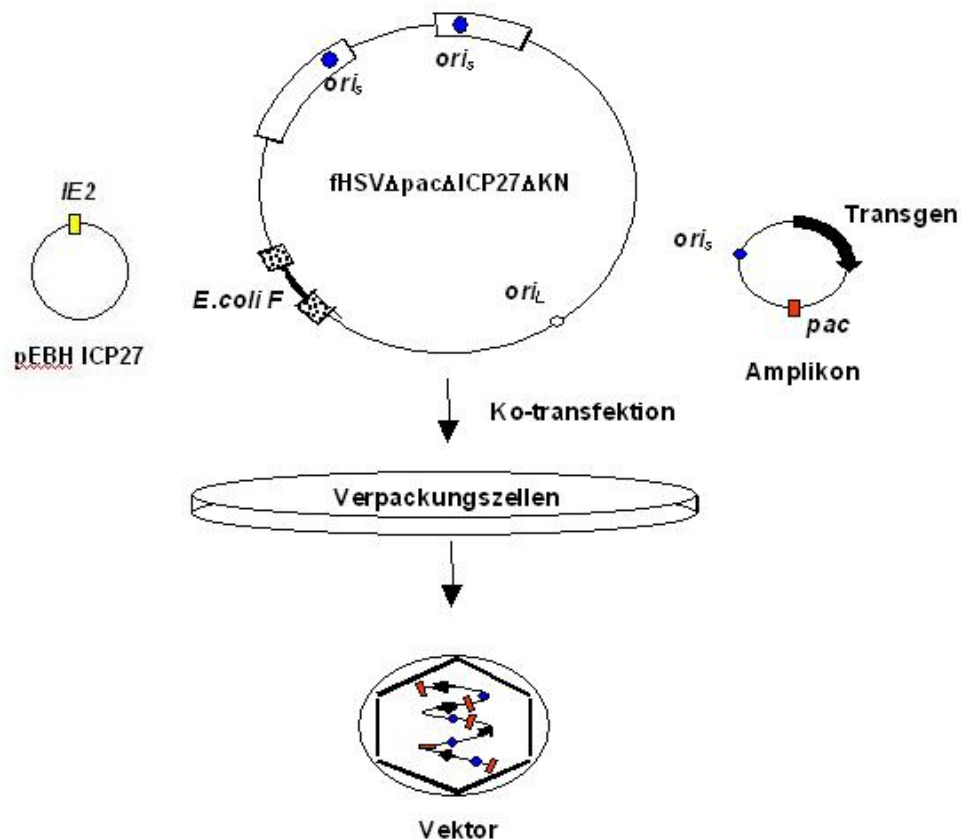


Abb. 5: Schematische Darstellung des helfervirusfreien Amplikonsystems. Die Verpackungszellen werden mit BAC (fHSVΔpacΔICP27ΔKN), dem Plasmid pEBH ICP27 und dem Amplikonplasmid ko-transfiziert. Die HSV-1-Helferfunktionen werden in *trans* von der BAC-DNA bereitgestellt. Es entstehen reine Amplikonvektoren ohne die Koexistenz von Helferviren.

1.4.3 HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren

Ein Problem für die Vektorentwicklung mit AAV stellt die limitierende Größe des zwischen den ITRs liegenden AAV-Genoms von 4,7 kb dar. Um auf dem viralen Genom Platz für die Promotor/Transgen-Kassette zu haben, mußten die Sequenzen für die viralen Rep- und Cap- Gene, die von den ITRs flankiert werden, entfernt werden. Die Deletion der Rep-Sequenzen führte jedoch zu einem Verlust der ortsspezifischen Integration (Ponnazhagan et al., 1997).

Um den Verlust der Rep-Expression zu kompensieren, wurden Hybridvektoren entwickelt, die die Rep-Gene in *trans* bereitstellen (Zweiplasmidsysteme). Diese Systeme basieren auf Adenoviren oder Baculoviren (Palombo et al. 1998; Recchia et al, 1999; Shayakhmetov et al., 2001). Obwohl die Hybridvektoren prinzipiell zeigen, dass mit einer Ko-expression von Rep eine ortsspezifische Integration von AAV rekonstruiert werden kann, ist die Rate der gezielten Integrationen in das humane Chromosom 19 sehr niedrig. Um dieses Problem zu lösen, wurden HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren entwickelt. Diese sollten das Einbringen der für die ortsspezifische Integration essentiellen AAV-Elemente (p5-Promotor (p5IEE), Rep und die das Transgen flankierenden ITRs) in *cis* auf einem Vektor ermöglichen und die Frequenz der ortsspezifischen Integrationen erhöhen (Johnston et al., 1997; Wang et al., 2002).

HSV/AAV-Hybridamplikonplasmide (Abb. 6) verfügen über den herpesviralen Replikationsursprung *ori_s* und das herpesvirale Verpackungssignal *pac*, die in Anwesenheit der HSV-1-Helferfunktion die Replikation und Verpackung der Amplikon-DNA zu Vektorpartikeln vermitteln. Das einzige AAV-Element, welches sich außerhalb der ITR flankierten Promotor/Transgen-Kassette befindet, ist das Rep-Gen unter der Kontrolle des AAV spezifischen p5-Promotors (p5IEE).

Wie auch bei der Verpackung der HSV-Amplikonvektoren können die HSV-1-Helferfunktionen bei der Verpackung der Hybridamplikonvektoren entweder von HSV-Helferviren oder dem BAC geliefert werden.

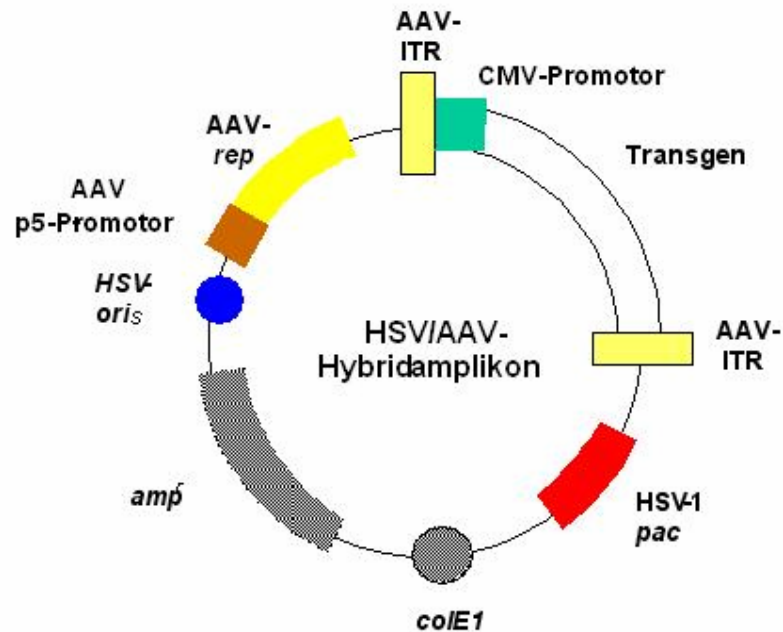


Abb. 6: Schematische Darstellung des HSV/AAV-Hybridamplikonvektors. Zusätzlich zu den HSV-1 Genen *oriS* und *pac*, die in Anwesenheit der HSV-1-Helferfunktion die Replikation und Verpackung der Amplikon-DNA zu Vektorpartikeln vermitteln, enthält dieser Vektor die AAV-Rep-Gene unter der Kontrolle des AAV-p5-Promotors und eine Transgenkassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors, die von den AAV „inverted terminal repeats“ (ITR) flankiert wird.

Die Zielzelltoxizität und die Vektorimmunogenität der HSV-1-Helferviren, die in den erfolgreich transduzierten Wirtszellen durch die virale Proteinexpression vermittelt werden, stellen für das Ziel einer langanhaltenden Expression des Transgens, wie dies beispielsweise bei den „korrektiven gentherapeutischen Ansätzen“ der Fall ist, ungünstige Vektoreigenschaften dar. Bei einer Immuntherapie dagegen könnte die endogene Immunogenität des Vektors in das immuntherapeutische Konzept derart eingebunden werden, dass durch die viralen Proteine als Adjuvant die Immunstimulation unspezifisch verstärkt würde.

Da in dieser Arbeit eine langanhaltende Expression des Transgens erreicht werden sollte, wurde ausschließlich mit helfervirusfreien HSV/AAV-Hybridamplikonstocks gearbeitet, die außer für das vom AAV abstammende Rep keine virale Proteinsynthese in den infizierten Zielzellen erfordern (Johnston et al., 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, dass HSV/AAV-Hybridamplikons tatsächlich in einen herpesviralen Mantel verpackt

werden können und dass die viralen Partikel Konkatemere von Amplikonkopien beinhalten (Fraefel et al., 1997; Johnston et al., 1997; Wang et al., 2002).

1.5 Hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen als Zielzellen für die Gentherapie

1.5.1 Gentransfer in humane hämatopoetische Stammzellen

Humane hämatopoetische Stammzellen besitzen die Fähigkeit, das hämatopoetische System in einem Empfänger, der myeloablativ vorbehandelt wurde und somit über keine eigene Blutbildung verfügt, vollständig und lebenslang zu rekonstruieren. Aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate können Stammzellen nach einer Stimulation mit Wachstumsfaktoren eine große Anzahl an funktionstüchtigen reifen Zellen erzeugen. Für die Transduktion der hämatopoetischen Zielzellen mit HSV-Amplikonvektoren und HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren stellen die Herpes virus entry (Hve)-Rezeptoren eine wichtige Voraussetzung dar, da sie eine Infektion der Zielzellen mit HSV-Vektoren erst ermöglichen. Die erste erfolgreiche Transduktion von CD34⁺-Stammzellen mit rekombinanten AAV gelang Zhou et al. (Zhou et al., 1994). Auch ein effizienter Gentransfer in isolierte humane CD34⁺-Stammzellen mit einem HSV-Amplikonvektor konnte bereits nachgewiesen werden (Müller, 2004).

1.5.2 Gentransfer in humane mesenchymale Stammzellen

Neben den hämatopoetischen Stammzellen werden mittlerweile auch die mesenchymalen Stammzellen (MSZ) in bezug auf die zelluläre Therapie erforscht. MSZ lassen sich leicht aus der adhärenenten Zellfraktion von mononuklearen humanen Knochenmarkzellen isolieren und *in vitro* expandieren (Koc et al., 2000; Pittenger et al., 1999) und besitzen eine hohe Migrationsfähigkeit, die den Einsatz als Trägersystem ermöglicht. MSZ können sich zudem aufgrund ihres hohen Differenzierungspotentials zu reifen Zellen vieler mesenchymaler Gewebe wie Knorpel-, Knochen- und Fettgewebe entwickeln (Herzog et al., 2003; Pittenger et al., 1999; van Damme et al., 2002).

Neben ihrem klinischen Gebrauch zur Geweberegeneration (Ringe et al., 2002) können MSZ auch als zelluläres System für die Behandlung monogenetischer Störungen verwendet werden (Asahara et al., 2000). In Tiermodellen konnte der therapeutische Gentransfer in MSZ für eine Anzahl an monogenetischen Erkrankungen bereits beschrieben werden, der in den meisten Fällen durch den Gebrauch von murinen onkoretroviralen Vektoren erreicht wurde (Baxter et al., 2002; Cherington et al., 1998; Chiang et al., 1999; Chuah et al., 2000; Niyibizi et al., 2001; Takenaka et al., 1999).

Die Tatsache, dass MSZ gut über allogene Barrieren zu transplantieren sind (Horwitz et al., 1999), ermöglicht zudem den Gebrauch als gut charakterisierte universelle Trägerzellen oder zelluläre Vehikel (Jorgensen et al., 2003). Besonders bei Erkrankungen wie Hämophilie A und B, die durch ein fehlerhaftes Genprodukt hervorgerufen werden, welches nicht auf hämatopoetische Zelllinien begrenzt ist, stellen MSZ ein attraktives Trägersystem für die Methoden der Gentherapie dar.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die übergeordnete Zielsetzung dieser Arbeit ist das Erreichen einer hocheffizienten und stabilen Transgenexpression in humanen Zielzellen einschließlich hämatopoetischer und mesenchymaler Stammzellen, wie sie für korrektive gentherapeutische Ansätze benötigt wird. Für dieses Ziel vereinigen HSV/AAV- Hybridamplikonvektoren die einzigartigen Merkmale ihrer Wildtyp-Formen auf eine ideale Art und Weise.

Im Hinblick auf diese Zielsetzung sollte zunächst die Herstellung von helfervirusfreien HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren optimiert werden, um mit diesen Vektoren eine initial hohe Transduktionseffizienz in den Zielzellen bei gleichzeitig niedriger Toxizität erreichen zu können. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob nach Transduktion mit den hergestellten HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren eine transiente und/oder stabile Transgenexpression in den Zielzellen möglich ist, wobei eine transiente Transgenexpression für die Kriterien einer gentherapeutischen Anwendung wie sie z.B. im Bereich der Vakzinierung benötigt werden, bereits ausreichen würde. Im Falle einer stabilen Integration sollte die Frequenz und die Ortsspezifität der Integration untersucht werden. Um die Bedingungen zu optimieren und die oben aufgeführten Ziele zu erreichen, wurden die initialen Versuche an der etablierten Modellzelllinie 293 durchgeführt.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien und Lösungen

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Life Technologies (Karlsruhe) oder Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen und mit dem Reinheitsgrad p.a. verwendet.

Die Zusammensetzung der Lösungen ist unter dem jeweiligen Versuchsprotokoll angegeben oder dem Laborhandbuch „Molekular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) entnommen.

2.2 Enzyme und Proteine

2.2.1 Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonuklease *EcoRI* sowie das dazugehörige Puffersystem wurden von der Firma New England, BioLabs (Frankfurt) bezogen.

2.2.2 Weitere Enzyme

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase („ <i>Taq</i> PCR Core Kit“)	Qiagen (Hilden)
RNase A	Roche (Mannheim)
Proteinase K	Sigma (Deisenhofen)
RNase-freie DNase I	Invitrogen (Karlsruhe)
Reverse Transkriptase	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg)

2.3 Puffer und Lösungen

2.3.1 Puffer für die Plasmidpräparation

Die Zusammensetzung der folgenden Puffer wurde dem Qiagen Plasmid Purification Handbook entnommen.

MATERIAL

Puffer 1	Resuspensions-Puffer; 50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Puffer 2	Lysis-Puffer; 200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS
Puffer 3	Neutralisations-Puffer; 3,0 M Kalium-Acetat pH 5,0
QBT-Puffer	Äquilibrierungs-Puffer; 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol; 0.15% (v/v) Triton X-100
QC-Puffer	Wasch-Puffer; 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol
QF-Puffer	Elutions-Puffer; 1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8,5; 15% (v/v) Isopropanol
TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.3.2 Puffer für die Southern Blot-Analyse

Hybridisierungspuffer	Church-Puffer, 0,5 M NaP _i ; 7% (w/v) SDS; 1 mM EDTA (Church and Gilbert, 1984)
Waschpuffer	40 mM NaP _i ; 1% (w/v) SDS

2.3.3 Sonstige Puffer

TNE-Puffer	0,1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
1 x TAE-Puffer	20 mM Tris-HCl; 10 mM Essigsäure; 1 mM EDTA
PBS	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freie phosphatgepufferte Salzlösung (PAA Laboratories, GmbH; Cölbe)
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution, ausgeglichene Salzlösung (Gibco/BRL (Karlsruhe))

2.4 Zusätze für die Transfektion

Lipofectamin	Gibco/BRL (Karlsruhe)
Plus TM -Reagenz	Gibco/BRL (Karlsruhe)

2.5 Nukleinsäuren

2.5.1 Bakteriell-artifizielles Chromosom (BAC)

fHSV Δ pac Δ ICP27 Δ KN Konstrukt, das durch die Klonierung des HSV-1-Genoms als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) entsteht und bei der Herstellung der Amplikonvektoren die Funktion der HSV-1-Helferviren übernimmt, indem es die erforderlichen HSV-1-Proteine in *trans* bereitstellt (Saeki et al., 1998).

2.5.2 Amplikonplasmide

2.5.2.1 HSV-1-Standardamplikonplasmid

pHSV Plasmid aus drei genetischen Elementen: (i) zwei HSV-1-Sequenzen, dem Replikationsursprung (*ori_S*) und dem Verpackungssignal (*pac*), die zur Replikation und Verpackung des Plasmids in Vektoren erforderlich sind; (ii) einer Transgenkassette unter Kontrolle des CMV-Promotors mit GFP als Markergen; und (iii) bakteriellen Sequenzen wie dem Replikationsursprung (*colE1*) und einer Antibiotikaresistenz (*amp^r*), welche die Propagation des Plasmids in *E. coli* Bakterien ermöglichen.

2.5.2.2 HSV/AAV-Hybridamplikonplasmid

pHSV/AAV Zusätzlich zu den drei genetischen Elementen von pHSV enthält dieses Plasmid die AAV-Rep-Gene mit dem davor geschalteten p5-Promotor und eine Transgenkassette mit GFP als Markergen, die von den AAV „inverted terminal repeats“ (ITR) flankiert wird.

Beide Plasmide wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Cornel Fraefel, Institut für Virologie der Universität Zürich, zur Verfügung gestellt.

2.5.3 Weitere Plasmide

pEBH ICP27	Plasmid, welches das im BAC-Plasmid deletierte essentielle Gen IE 2 (immediate early protein 2) liefert.
pRVK	Matritze zur Herstellung der AAVS1-Sonde für die Southern Blot-Analyse.

2.5.4 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Sämtliche als PCR-Primer verwendete Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

2.5.4.1 Sequenzen der spezifischen Primer für β -Aktin

7-95 β -Aktin 3'	5'-CACGGAGTACTTGCGCTCAGGAGG-3'
24-93 β -Aktin 5'	5'-CATGCCATCCTGCGTCTGGAC-3'

2.5.4.2 Sequenzen der spezifischen Primer für die Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren A, B und C

HveA	5'-GCATGGAGCCTCCTGGAGAC-3'
	5'-CTCCTTGCAGGACGGCAGAG-3'
HveB	5'-ATGGAACCAGATGGCAAGGATGAG-3'
	5'-ACTGCCCCGCCGTGAGATGAG-3'
HveC	5'-CGGCCCTACTTCAC
	5'-CTTGGAATGAAAGACCCGTCGTTC-3'

2.5.4.3 Sequenzen der spezifischen Primer für GFP

GFP1	5'-GGATCCATCGCCACCATGGTGAGCAAGGGC-3'
GFP2	5'-GTCGCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTC-3'

2.5.4.4 Sequenzen der spezifischen Primer für AAVS1

AAVS1 79	5'-ACTTTGAGCTCTACTGGCTTC-3'
AAVS1 80	5'-GGATCCGCTCAGAGG-3'

2.5.4.5 Sequenzen der spezifischen Primer für Rep

Rep 5`	5`-GAACGCGATATCGCAGCCGCCATGCCGGG-3`
RepNT3`	5`-GGATCCGAATTCACTGCTTCTCCGAGGTAATC-3`

2.5.5 DNA-Fragmentlängenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese

GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
1 kb Plus DNA Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
1 kb DNA Ladder	Gibco/BRL (Karlsruhe)

2.6 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Für einige Standardreaktionen/-verwendungen der Molekularbiologie werden Reagenziensysteme angeboten. Es wurden folgende gebrauchsfertige Reagenziensysteme eingesetzt.

RNase free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup	Qiagen (Hilden)
QIAquick, PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Midi/Maxi-Preparation Kit	Qiagen (Hilden)
Taq PCR Core Kit	Qiagen (Hilden)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg)

2.7 Bakterienstämme

Die verwendeten transformationskompetenten *E. coli*-Stämme hatten folgenden Genotyp:

DH5 α (Clontech (Heidelberg)): F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17(r $_k^-$ m $_k^+$ phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1)

XL1 Blue (Stratagene (La Jolla, USA)): recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI q Z Δ M15 Tn10 (Tet r)]

2.8 Medien zur Anzucht der Bakterienstämme

LB-Flüssigmedium	20 g LB Broth (Sigma)/1L Aqua dest.
Fester LB-Nährboden	35 g LB Agar (Sigma)/1L Aqua dest.

2.9 Zellen

2.9.1 Verpackungszelllinie

2-2-Verozellen Verpackungszelllinie für das helfervirusfreie Amplikonsystem mit dem essentiellen Verpackungssignal pac (Smith et al., 1992); die Zellen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Cornel Fraefel, Institut für Virologie der Universität in Zürich, zur Verfügung gestellt.

2.9.2 Adhärent wachsende Zelllinien

293 Humane embryonale Nierenzellen; die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Carsten Bury, Klinik für Kinder-Hämatologie, -Onkologie und -Immunologie der Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

2.9.3 Lymphohämatopoetische Zelllinien

Jurkat	humane T-Zell-Leukämiezellen, The American Type Culture Collection (ATCC), (Manassas (VA), USA)
KG-1a	humane akute myeloische Leukämiezellen (ATCC)
K562	humane chronische myeloische Leukämiezellen (ATCC)

2.9.4 Primäre Zellen

CD34+-Zellen Humane hämatopoetische Stammzellen; die Gewinnung der CD34+-Zellen erfolgte aus Nabelschnurblut; die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Moritz, Labor für experimentelle Hämatologie und Gentherapie des westdeutschen Tumorzentrums, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt.

MSZ Humane mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark; die Zellen wurden freundlicherweise von PD Dr. Dagmar Dilloo, Klinik für Kinder-Hämatologie, -Onkologie und -Immunologie der Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

Alle Spender bzw. deren Angehörige haben ihr Einverständnis erklärt, dass die Zellen für Forschungszwecke verwendet werden.

2.10 Kulturmedien und Zusätze

Dulbecco`s MEM	Gibco/BRL (Karlsruhe)
RPMI 1640	Gibco/BRL (Karlsruhe)
OptiMEM I reduced Serum Medium	Gibco/BRL (Karlsruhe)
L-Glutamin, 200mM	Gibco/BRL (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (10 000 E/ml)	Gibco/BRL (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum (FKS), Lot: P231806	Gibco/BRL (Karlsruhe)
Genitacin (G418)	Gibco/BRL (Karlsruhe)

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Techniken

Alle nicht gesondert aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Protokollen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel, 1992) durchgeführt.

3.1.1 Transformation von Bakterien

60 bis 100 µl frisch aufgetaute transformationskompetente *E. coli*-Stämme DH5α (Clontech, Heidelberg) oder XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA) wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,2 µl Plasmid-DNA gemischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 2 min. auf 42°C erwärmt, auf Eis abgekühlt und nach der Zugabe von 0,5 ml LB-Medium für 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien durch Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf, 1400 rpm, 5 min., RT) sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Bakterien in den verbliebenen ca. 100 µl LB-Medium resuspendiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf einer Selektions-Agarplatte mit einem Ampicillingehalt von 50 µg/ml ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert.

3.1.2 Herstellung von Glycerindauerkulturen

Zur Herstellung einer Glycerinkultur der Amplikonplasmide wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Dazu wurde in ein 15 ml-Falconröhrchen mit 2 ml LB-Medium und einem Ampicillingehalt von 50 µg/ml eine gepickte Kolonie der Transformationsplatte gegeben und üN bei 37°C und 180 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend wurden 300 µl oder 700 µl der Vorkultur in einem Eppendorfgefäß mit 87% (v/v) Glycerin auf 1 ml aufgefüllt, gut gemischt und bei –80°C gelagert.

3.1.3 Herstellung von CsCl-gesättigtem Butanol

Für die Herstellung des mit CsCl-gesättigten Butanols wurden 100 mg CsCl in eine 250 ml-Glasflasche (Schott) eingewogen, mit einer dünnen Schicht Aqua dest. bedeckt und

anschließend das vierfache Volumen an gelöstem Butanol zugegeben. Zur Sättigung des Butanols wurde solange CsCl zugegeben, bis die CsCl-Kristalle am Boden der Flasche lagen und nicht mehr in Lösung gingen.

3.2 DNA-Methoden

3.2.1 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration einer DNA-Präparation wurde diese 10- bis 100-fach verdünnt und die Absorption (A_{260}) im UV-Spektrometer (Photometer: Spectrophotometer, Beckman Coulter DV 640B; Küvette: Qs 1001) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zur Berechnung der DNA-Konzentration wurde die folgende Formel verwendet:

$$(A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50) : 1000 = x \text{ } \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$$

Als Kriterium für die Verunreinigung der Präparation mit Proteinen oder RNA wurde der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass bei einem $A_{260} : A_{280}$ -Verhältnis zwischen 1,8 und 2 reine DNA, bei Werten kleiner als 1,8 DNA mit Protein-Verunreinigungen und bei Werten größer als 2 DNA mit RNA-Verunreinigungen vorliegt.

3.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

3.2.2.1 Plasmidpräparation von fHSV Δ pac Δ ICP27 Δ KN (BAC)

Zur Herstellung von 4 L BAC-Kultur zur Vermehrung des Plasmids in *E. coli*-Bakterien wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. In 3 ml LB-Medium mit einem Chloramphenicolgehalt von 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde eine Pipettenspitze der BAC-Glycerinkultur gegeben und das Medium 8 h bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Je 1 L LB-Medium mit einem Chloramphenicolgehalt von 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde mit 500 μl der BAC-Vorkultur angeimpft und die Kulturen üN bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden je 2 L der Kultur in sechs 500 ml-Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (Beckman J2-21, JA-10, 6000 rpm, 5 min., 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und der Vorgang mit den verbleibenden 2 L Kultur in denselben

Zentrifugenbechern wiederholt. Die Sedimente wurden anschließend in 7,5 ml eiskaltem Puffer 1 (Kapitel 2.3.1) resuspendiert, auf vier 250 ml-Zentrifugenbecher verteilt und mit eiskaltem Puffer 1 auf 40 ml aufgefüllt. Zur Lyse wurden 40 ml Puffer 2 je Zentrifugenbecher zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens über Kopf sorgfältig sechsmal gemischt. Die Ansätze wurden 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 40 ml eiskaltem Puffer 3 neutralisiert. Durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens über Kopf wurde nochmals sorgfältig gemischt und die Zentrifugenbecher für 30 min. auf Eis inkubiert, wobei der Mischvorgang alle 10 min. wiederholt wurde. Die Ansätze wurden zentrifugiert (Beckman J2-HS, JA-14, 10000 rpm, 30 min., 4°C) und der Überstand durch einen mit Aqua dest. befeuchteten Faltenfilter (Schleicher&Schuell; Folded Filters, Porendurchmesser 125 mm) in vier neue 250 ml Zentrifugenbecher filtriert. Zur Fällung der DNA wurden zu dem Filtrat 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und wiederum sorgfältig gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurden die Sedimente mit 20 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (Beckman J2-HS, JA-14, 10000 rpm, 10 min., 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Zentrifugenbecher bei Raumtemperatur längere Zeit stehengelassen, um das verbliebene Ethanol verdampfen zu lassen. Die Sedimente wurden in jeweils 2 ml TE-Puffer (65°C) resuspendiert und mit je 5,5 ml QBT-Puffer versetzt. Je zwei Ansätze wurden gepoolt und nochmals das gleiche Volumen an QBT-Puffer zugegeben. Die resuspendierten Sedimente wurden durch einen mit Aqua dest. angefeuchteten Faltenfilter auf zwei mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Säulen 500 (Qiagen Plasmid Kit) geladen. Nach dem Laden der Säulen wurden diese zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen und die DNA anschließend mit je 15 ml QF-Puffer (65°C) in zwei 50 ml-Falcontubes eluiert. Zur Fällung der DNA wurden 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben und sorgfältig gemischt.

Nach Zentrifugation (Beckman J2-HS, JA-12, 10000 rpm, 30 min., 4°C) wurde der Überstand vorsichtig verworfen und zu jedem Sediment 1,5 ml TE-Puffer (65°C) gegeben. Nach 5 min. wurden die Sedimente gut resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Zur Reinigung und Isolierung der BAC-Plasmid-supercoil (sc)- bzw. BAC-Plasmid-relaxed-circle (rc)-Form wurde eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. In zwei Beckman-Ultrazentrifugenröhrchen (Quick-Seal 13 x 51 mm) wurden je 3,8 g CsCl eingewogen. Zu dem CsCl wurden mit Hilfe einer 5 ml-Spritze (Omnifix, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit grüner Kanüle (Terumo, Neolus, 0,8 mm) 1,5 ml des resuspendierten Sediments und 330 µl EtBr (10 mg/ml, Invitrogen (Karlsruhe)) gegeben und das Röhrchen mit TE-Puffer ohne Luftblasen bis zum Hals aufgefüllt. Nach dem Austarieren wurden diese mit einem Beckman-Tube-Sealer verschlossen und die Dichtheit mit einem Papiertuch überprüft. Anschließend wurde eine Ultrazentrifugation (L8-70M-Ultrazentrifuge, VTI 65, 60000 rpm, 16 h, 20°C) durchgeführt. Die Identifizierung der BAC-Plasmid-sc- bzw. BAC-Plasmid-rc-Bande erfolgte unter UV-Licht. Zur Gewinnung der beiden Banden wurden die Röhrchen in einem Stativ fixiert und durch das Einstechen mit einer grünen Kanüle (0,8 mm) knapp unterhalb des Halses belüftet. Unter UV-Licht wurde zunächst die untere Bande (sc-Form) mit einer 5 ml Spritze mit grüner Kanüle und anschließend die obere Bande (rc-Form) abgezogen und in 15 ml-Falcontubes überführt. Das EtBr wurde durch die Extraktion von mit CsCl-gesättigtem Butanol solange herausgewaschen, bis die rötliche Farbe der Butanol-Phase vollständig entfernt war. Die DNA wurde in einen mit TE-Puffer vorbehandelten Dialyseschlauch (ZelluTrans ROTH, MWCO: 8,000-10,000) überführt und dieser zum Entsalzen der DNA in 1,6 L TE Puffer bei 4°C dialysiert. Der Puffer wurde während der Dialyse drei- bis viermal gewechselt. Im Anschluß wurde die DNA in zwei 30 ml-Corex-Glaszentrifugenröhrchen überführt und das jeweilige Volumen bestimmt. Zur Fällung der DNA wurde 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und drei Volumen 100% Ethanol zugegeben und die Röhrchen nach vorsichtigem Schwenken für 30 bis 60 min. bei -20°C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (Beckman J2-HS, JA-12, 12000 rpm, 30 min., 4°C) wurden die Überstände vorsichtig verworfen und das Sediment mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurden die Sedimente in 300 µl TE-Puffer resuspendiert, in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (Kapitel 3.2.1).

3.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung einer größeren Menge Plasmid-DNA für die Transfektion (Kapitel 3.5) wurden Plasmid-Maxi-Präparationen mit dem „Plasmid Midi/Maxi-Preparation Kit“ der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer gelöst und die Konzentration photometrisch ermittelt (Kapitel 3.2.1).

3.2.2.3 Isolierung von DNA

Zur Isolierung von DNA aus verschiedenen Zelllinien wurden 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen eingesetzt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert (Multifuge 4KR, Heraeus, 1400 rpm, 5 min, RT), der Überstand abgesaugt und das Sediment in 1 ml PBS resuspendiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Sediment in 2 ml TNE-Puffer gut resuspendiert, mit einer 1000 ml-Pipette tropfenweise 2 ml TNE-SDS (0,1% SDS) zugegeben und homogenisiert. Zum Abbau der Proteine wurde Proteinase K (60 µg/ml) zu den Zellen pipettiert und diese bei 37°C üN inkubiert.

Am nächsten Tag wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde 1 Volumen Phenol (Ultra PureTM Buffer-Saturated Phenol, Invitrogen (Karlsruhe)) zu den Zellen gegeben, gut gemischt und nach der Zentrifugation (Beckman J2-HS, JA-12, 10000 rpm, 5 min., RT) die obere Phase einschließlich der DNA vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Nach der Zugabe von 1 Volumen Chloroform zur Entfernung von Phenolresten wurde nochmals zentrifugiert (s.o.) und wiederum die obere Phase vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt. Zur Fällung der DNA wurden anschließend 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und 3 Volumen 100% Ethanol zugegeben und die Röhrchen für mindestens 2 h bei -20°C gestellt. Durch eine Zentrifugation (Beckman J2-HS, JA-12, 14000 rpm, 5 min., RT) wurde die gefällte DNA sedimentiert, der Überstand verworfen, das Sediment kurz an der Luft getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch (Kapitel 3.2.1).

3.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion erlaubt die Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente *in vitro* mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase.

Die PCR wurde zum Nachweis des Transgens GFP und des Regulatorproteins Rep in den Zielzellen, welche zuvor mit Amplikonvektoren infiziert wurden, durchgeführt.

Für die PCR-Amplifikation wurde die DNA der Zellen isoliert (Kapitel 3.2.2.3). Für die PCR wurde der „*Taq* PCR Core Kit“ verwendet. Jede PCR-Amplifikation wurde in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt, bestehend aus 2,5 µl 10 x Puffer, 0,25 µl dNTP (10 mM), 0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 Units/µl), 17,05 µl H₂O, je 0,5 µl der spezifischen „sense“ und „antisense“ Primer für GFP bzw. Rep und 5 µl des templates (20 pg/µl). Jeder Ansatz wurde in einem Trio Thermblock™ (Biometra^R, Göttingen) über 35 Zyklen mit dem folgenden Temperaturprofil amplifiziert:

<u>Temperaturprofil:</u>	4 min. 94°C Denaturierung	
	1 min. 94°C Denaturierung	
	30 sek. 56°C Primer-Bindung	} 35 x
	1 min. 72°C Elongation	
	10 min. 75°C terminale Elongation	

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in einer Horizontal-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4).

3.2.4 Analyse von DNA in Agarosegelen

Abhängig von der Größe der nachzuweisenden DNA-Fragmente wurde ein 1- bis 2,5%-iges Agarosegel hergestellt. Die benötigte Menge an Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit einer Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 1 µg/ml) versetzt. Die Agarose wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Taschenformer in das noch flüssige Gel gesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden mit einem 6 x Loading Buffer (MBI, Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und nach der Aushärtung des Gels in die geformten Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in

1 x TAE Puffer bei 80 V. Zur Auswertung wurde der Fluor-S-Multimager und die Multianalyst-Software (Bio-Rad, München) verwendet. Die Größe des DNA-Fragments wurde anhand eines mitgeführten DNA-Längenmarkers bestimmt, von dem 0,5 bis 1 µg auf das Gel aufgetragen wurden.

3.2.5 Southern Blot-Analyse

3.2.5.1 DNA-Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese

Der Southern Blot ermöglicht die Identifizierung eines bestimmten Gens aus der Gesamt-DNA einer Zelle. Vor der Durchführung dieser Methode (Sambrook et al., 1989) wurde die DNA der Zellen mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnitten. Pro Restriktionsansatz wurden 40 µg DNA eingesetzt und mit einem 10-fachen Überschuss an Enzym versetzt. Zu jedem Ansatz wurden weiterhin 20 µl des vom Hersteller empfohlenen Puffers (New England BioLabs, Frankfurt) zugegeben und mit H₂O ein Endvolumen von 200 µl eingestellt. Die Restriktionsansätze wurden gut gemischt und üN bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden die Restriktionsansätze gefällt und in 40 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Auftrennung der Fragmente wurden je 20 µl der Ansätze auf ein 0,7%-iges Agarosegel (20 x 20 x 0,8 cm) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte üN bei 38 V.

3.2.5.2 Transfer von DNA

Da nur einzelsträngige Nukleinsäuren an positiv geladene Nylonmembranen und Hybridisierungssonden binden können, wurde das Gel vor dem DNA-Transfer mit 0,25 M HCl depuriniert und anschließend für einige Minuten in 0,4 M NaOH denaturiert. Der Transfer der DNA-Fragmente wurde nach der von Koetsier et al. (Koetsier et al. 1993) modifizierten Methode durch Kapillarkräfte in Richtung der Schwerkraft von oben nach unten auf die positiv geladene Nylonmembran (Membran Hybond-N+, 0,45 µm, Amersham Biosciences, München) durchgeführt. Auf einen Stapel von Papiertüchern wurden drei trockene und zwei mit 0,4 M NaOH getränkte Filter (Gel-Blotting-Paper, Schleicher&Schuell, Dassel) gelegt. Anschließend wurde die Nylonmembran entsprechend der Gelgröße zugeschnitten, ebenfalls in NaOH getränkt und auf den Filtern positioniert.

Auf dem Gel wurden zwei weitere mit NaOH getränkte Filter positioniert, gefolgt von zwei langen getränkten Filtern, welche eine Flüssigkeitsbrücke zwischen zwei mit 0,4 M NaOH gefüllten Wannen bildeten, die rechts und links neben dem Stapel standen. Zum Abschluss wurde auf den Stapel eine Plastikfolie gelegt und die Papiertücher um das Gel mit Plastikstreifen bedeckt. Das Prinzip dieses Aufbaus beruht darauf, dass die Transferlösung aufgrund von Kapillarkräften durch das Gel und die Filter in die Papiertücher gesaugt wird. Die Nukleinsäuren werden aus dem Gel auf die positiv geladene Nylonmembran transferiert. Nach 5 bis 6 h wurde die Nylonmembran 5 min. in 2 x SSC (0,15 M Natriumchlorid, 0,015 M Natriumcitrat) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für zwei Stunden in einem Inkubator bei 80°C getrocknet.

3.2.5.3 Herstellung von DNA-Sonden

Für die Herstellung der DNA-Sonden wurde zunächst eine PCR (Kapitel 3.2.3) mit dem „*Taq* PCR Core Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Für die Herstellung der GFP- (747 bp) und der Rep-Sonde (744 bp) wurde als template das Plasmid pHSV/AAV, für die Herstellung der AAVS1-Sonde das Plasmid pRVK verwendet. Jede PCR-Amplifikation wurde in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt, bestehend aus 2,5 µl 10 x Puffer, 0,25 µl dNTP (10 mM), 0,2 µl Taq-Polymerase (5 Units/µl), 16,55 µl H₂O, 0,25 µl der spezifischen „sense“ und „antisense“ Primer für GFP, Rep und AAVS1 (100 pmol/µl) und 5 µl des templates (20 pg/µl). Jeder Ansatz wurde in einem Trio ThermblockTM (Biometra^R, Göttingen) über 35 Zyklen mit dem folgenden Temperaturprofil amplifiziert:

Temperaturprofil:

10 min. 94°C Denaturierung	
1 min. 94°C Denaturierung	} 35 x
1 min. 60°C Primer-Bindung	
1 min. 72°C Elongation	
10 min. 72°C terminale Elongation	

Die Aufreinigung des PCR-Produktes wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Zur Fällung der DNA wurde anschließend 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und drei Volumen 100% Ethanol zugegeben und der Ansatz nach vorsichtigem Schwenken für 1 bis 2 h bei –20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, 13000 rpm, 30 min., 4°C) wurden die Überstände vorsichtig verworfen und zum Waschen zu jedem Sediment 100 µl 70% Ethanol pipettiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, 13000 rpm, 10 min., 4°C) wurden die Sedimente in 20 µl Aqua dest. resuspendiert, in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (Kapitel 3.2.1).

3.2.5.4 Markierung von DNA-Sonden

Für den Nachweis der DNA anhand der komplementären Sonden wurden diese mit ³²P radioaktiv markiert. Die radioaktive Markierung der Sonden wurde von der Firma Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig durchgeführt.

3.2.5.5 Prähybridisierung und Hybridisierung

Zur Absättigung aller freien DNA-Bindestellen auf dem Filter wurde zunächst eine Prähybridisierung durchgeführt, damit bei der späteren Hybridisierung die mit ³²P radioaktiv markierten Sonden nicht unspezifisch an den Filter, sondern nur an die geblottete, denaturierte und spezifische DNA binden. In einem Hybridisierungsofen wurde die Membran für 20 min. bei 65°C in 10 ml Hybridisierungspuffer (Church-Puffer (0,5 M

NaP_i, 7% (w/v) SDS, 1 mM EDTA, Church and Gilbert, 1984) ohne radioaktive Sonde inkubiert.

Die markierte Sonde wurde durch einminütiges Erhitzen auf 100°C denaturiert. Die Prähybridisierungslösung wurde abgeschüttet und ein Hybridisierungspuffer mit der markierten DNA-Sonde von ca. 2×10^6 cpm/ml zur Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte üN bei 65°C. Die Prähybridisierung und Denaturierung der Sonden sowie die anschließende Hybridisierung wurden von Dr. Bertram Opalka und Dr. Sepideh Fanaei im Labor für experimentelle Hämatologie und Gentherapie des westdeutschen Tumorzentrums, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt.

3.2.5.6 Waschen der Membran und Detektion

Um unspezifisch an die Membran gebundene Sonden zu entfernen, wurde die Membran dreimal für 20 min. in einem Waschpuffer (40 mM NaP_i; 1% (w/v) SDS) bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie gehüllt und in eine Röntgenkassette gelegt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms und einer 12- bis 24-stündigen Exposition konnte nach der Entwicklung des Films der Southern Blot ausgewertet werden. Die Detektion des Blots wurde unter Mithilfe von Dr. Bertram Opalka und Dr. Sepideh Fanaei im Labor für experimentelle Hämatologie und Gentherapie des westdeutschen Tumorzentrums, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt.

3.3 RNA-Methoden

3.3.1 Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung aus verschiedenen Zellen wurde nach dem „RNeasy Mini Protocol for the Isolation of Total RNA from Animal Cells“ der Firma Qiagen (RNeasy Mini Kit) nach Herstellerangaben durchgeführt und die isolierte RNA in 50 µl RNase-freies Wasser aufgenommen.

3.3.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der reversen Transkription wird mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase

(= reverse Transkriptase) die genetische Information der RNA in cDNA überschrieben. Dieser Vorgang wird als revers bezeichnet, da im Vergleich zur Mehrzahl zellulärer Transkriptionsvorgänge die Informationsüberschreibung in umgekehrter Richtung erfolgt. Spezifische Transkripte können in einer nachfolgenden PCR mit der cDNA als template amplifiziert werden.

3.3.2.1 RT-PCR mit hämatopoetischen CD34+-Stammzellen

Die RT-PCR mit primären CD34+-Stammzellen wurde zum Nachweis von Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren eingesetzt.

Aus $3,2 \times 10^6$ oder 5×10^6 primären CD34+-Stammzellen wurde die RNA isoliert (Kapitel 3.3.1) und zur Präparation der cDNA eine reverse Transkription nach Standardprotokoll des First Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) durchgeführt. Es wurden 8 µl RNA in einem Endvolumen von 15 µl eingesetzt und der bifunktionale Primer NotI-d(T)₁₈ verwendet.

Für die PCR-Amplifikation der spezifischen Gene wurde der „*Taq* PCR Core Kit“ verwendet. Es wurden 4 µl cDNA zusammen mit jeweils einem Paar „sense“ und „antisense“ der spezifischen Primer für die Hve-Rezeptoren A, B oder C verwendet.

β-Aktin diene als Positivkontrolle, da es in allen Zellen enthalten ist. Jede Amplifikation wurde in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt, bestehend aus 4 µl cDNA, 2,5 µl 10 x Puffer, 0,25 µl dNTP (10 mM), je 0,1 µl der spezifischen „sense“ und „antisense“ β-Aktin-Primer (100 pmol/µl), 0,2 µl Taq-Polymerase (5 Units/µl), 16,9 µl H₂O und 0,5 µl der spezifischen „sense“ und „antisense“ Hve-Primer (100 pmol/µl). Jeder Ansatz wurde in einem Trio ThermblockTM (Biometra^R, Göttingen) über 35 Zyklen mit dem folgenden Temperaturprofil amplifiziert:

<u>Temperaturprofil:</u>	10 min. 94°C Denaturierung	
	1 min. 94°C Denaturierung	} 35 x
	1 min. 60°C Primer-Bindung	
	1 min. 72°C Elongation	
	10 min. 72°C terminale Elongation	

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in einer Horizontal-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4).

Die spezifischen Hve-Intensitäten wurden in Beziehung zu den gleichzeitig erhobenen Intensitäten des β -Aktins gesetzt und das Verhältnis der Hve-spezifischen Intensität zur β -Aktin-Kontrolle dargestellt.

3.3.2.2 RT-PCR mit 293-Zellen

Die RT-PCR wurde zum Nachweis der mRNA des Rep-Proteins in 293-Zellen eingesetzt, die zuvor mit verschiedenen Amplikonvektoren infiziert wurden. Die RNA wurde 24 h nach Transduktion der 293-Zellen (Zellzahl am Tag der Transduktion: 2×10^5) isoliert (Kapitel 3.3.1). Zur Reinigung der RNA wurde ein DNase-Verdau mit Hilfe des RNase free DNase Sets der Firma Qiagen nach dem „RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die anschließende Präparation der cDNA wurden 20 μ l RNA in einem Endvolumen von 33 μ l eingesetzt und für jeden Amplifikationsansatz der bifunktionale Primer pd(N)₆ verwendet. Zur Kontrolle des DNA-Verdaus wurden gleichzeitig Ansätze ohne den benötigten Reaktions-Mix angesetzt.

Für die PCR-Amplifikation wurde der „Taq PCR Core Kit“ zusammen mit den spezifischen Rep-Primern für den Nachweis des „Rep-Gens“ und den Primern für den Nachweis von β -Aktin verwendet. Für jeden Amplifikationsansatz wurden je nach Verdünnung 0,05 bis 5 μ l cDNA (Gesamtvolumen 5 μ l), 2,5 μ l 10 x Puffer, 0,25 μ l dNTP (10mM), je 0,1 μ l der spezifischen β -Aktin-Primer (100 pmol/ μ l), je 0,5 μ l der Rep-spezifischen Primer Rep5' und RepNt3' (100 pmol/ μ l) für den Nachweis des „Rep-Gens“ und 0,2 μ l Taq-Polymerase (5 Units/ μ l) in einem Endvolumen von 25 μ l eingesetzt. Jeder Ansatz wurde in einem Trio ThermblockTM (Biometra^R, Göttingen) über 35 Zyklen mit dem folgenden Temperaturprofil amplifiziert:

<u>Temperaturprofil:</u>	4 min. 94°C Denaturierung	
	1 min. 94°C Denaturierung	} 35 x
	30 sek. 56°C Primer-Bindung	
	1 min. 72°C Elongation	
	10 min. 75°C terminale Elongation	

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in einer Horizontal-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.4).

3.4 Zellkulturtechniken

3.4.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien und primären Zellen erfolgte in Zellkulturgefäßen (Corning Costar, Bodenheim; BD Falcon, Bedford MA, U.S.A.) in entsprechendem Kulturmedium mit den jeweils benötigten Zusätzen in dafür vorgesehenen Inkubatoren unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 98% Luftfeuchtigkeit).

Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Suspensionszellen wurden gleichmäßig im Medium verteilt und 1:5 bis 1:20 in ein neues Medium umgesetzt.

Bei adhärent wachsenden Zellen wurde das Medium zunächst abgesaugt, die Zellen zweimal mit Ca²⁺/Mg²⁺-freier PBS gewaschen und für 5 min. mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/ 0,02% (w/v); PAA Laboratories, GmbH; Cölbe) im Brutschrank inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, die abgelösten Zellen im Medium resuspendiert und 1:2 bis 1:20 in neue Zellkulturflaschen gesplittet.

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte in regelmäßigen Abständen nach Trypanblau Ausschlussfärbung und Auszählung der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer.

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze (Gibco/BRL (Karlsruhe))
293	DMEM mit 4,5 g/L Glucose	10% (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin
2-2-Verozellen	DMEM mit 4,5 g/L Glucose	10% (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin 500 µg/ml Geneticin G418
2-2-Verozellen nach Zugabe des Amplikons	DMEM mit 4,5 g/L Glucose	6% (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin
Jurkat, KG1a, K562	RPMI 1640	10% (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin
CD34+-Zellen	RPMI 1640	10% (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin 50 ng/ml der Zytokine SCF, IL-3 und flt-3L (R&D Systems, Wiesbaden, oder Cellgenics, Freiburg)
MSZ	DMEM mit 4,5 g/L Glucose	10% (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin 3 ng/ml Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF

Tab. 2: Übersicht der Zelllinien mit den verwendeten Kulturmedien und benötigten Zusätzen.

3.4.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Die Suspensionszellen oder die zuvor mit Trypsin abgelösten adhärent wachsenden Zellen wurden zentrifugiert (Multifuge 4KR, 1400 rpm, 5 min., RT) und anschließend in Einfriermedium (50% (v/v) FKS; 40% (v/v) RPMI; 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (Sigma)) resuspendiert (1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/1,8 ml). Zur Langzeitlagerung wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen (Corning Costar, Bodenheim) überführt und in mit

Isopropanol gefüllten Einfriercontainern (Nalgene Labware, Rochester, NY, USA) zunächst bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in ein Falconröhrchen mit Medium überführt, zentrifugiert (s.o.), in Medium resuspendiert und zur Kultivierung in Kulturflaschen pipettiert.

3.5 Herstellung der helfervirusfreien HSV-1-Amplikonvektoren und der helfervirusfreien HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren

3.5.1 Transfektion der 2-2-Verpackungszelllinie

Einen Tag vor der Transfektion wurden $1,2 \times 10^6$ 2-2-Verozellen (Kapitel 2.9.1) auf einer beschichteten 60 mm-Zellkulturplatte in 3 ml Medium (ohne G418) ausplattiert und unter Standardkulturbedingungen im Brutschrank kultiviert.

Am folgenden Tag wurden pro 60 mm-Zellkulturplatte zwei 15 ml-Falconröhrchen vorbereitet. In das erste Röhrchen wurden 250 μl OptiMEM I und 16,8 μl Lipofectamin vorgelegt und gemischt. In das zweite Röhrchen wurden 250 μl OptiMEM I und 2 μg fHSV $\Delta\text{pac}\Delta\text{ICP27}\Delta\text{KN}$ (BAC) (wahlweise supercoil- oder relaxed-circle-Form oder beide Formen gepoolt), 0,2 μg pEBH ICP27 und 2 μg des HSV-Amplikon- bzw. des HSV/AAV-Hybridamplikonplasmids pipettiert und gemischt. Um durch die Präparation des Transfektionskomplexes eine Verbesserung der Transfektionseffizienz zu erzielen, wurden in das zweite Falconröhrchen je nach Versuchsaufbau noch 10 μl PlusTM-Reagenz (Gibco/BRL (Karlsruhe)) gegeben. Die Zugabe wurde langsam durchgeführt, um das Ausfallen der DNA zu vermeiden. Der Inhalt der beiden Röhrchen wurde langsam mit einer 1000 μl -Pipette zusammengeführt und vorsichtig gemischt. Die Vorbereitung und Vereinigung der beiden Röhrchen wurde in Form von Einfach-, Doppel- sowie Dreifachansätzen durchgeführt. Die Ansätze wurden für 20 bzw. 45 min. bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die 2-2-Verozellen zur Vorbereitung auf die Transfektion zweimal mit je 2 ml OptiMEM I gewaschen und schließlich die

DNA/Lipofectamin-Suspension tropfenweise mit einer 5 ml-Pipette auf die Zellen gegeben. Zur Inkubation wurden die Zellen für 4 bzw. 5,5 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die DNA/Lipofectamin-Suspension abgesaugt und die Zellen dreimal mit je 2 ml OptiMEM I gewaschen. Auf jede Platte wurden 3,5 ml DMEM (6% FKS und ohne G418) pipettiert und die Zellen für zwei bis vier Tage inkubiert.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen zunächst unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, um den zytopathischen Effekt, der zwei Tage nach der Transfektion bei ca. 50% der 2-2-Verozellen vorliegen sollte, sowie die Expression des Transgens beurteilen zu können.

3.5.2 Virusernte

Für die Virusernte wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Cell scraper, Nalge Nune International, Naperville, USA) vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und drei identische Ansätze in einem 15 ml-Falconröhrchen gepoolt. Das Röhrchen wurde dreimal in einem Gemisch aus Trockeneis und 70% Ethanol schockgefroren und anschließend im Wasserbad (Thermomix 1420, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) wieder aufgetaut. Alternativ wurde das Röhrchen nach dem Lösen der Zellen vom Boden der Platte bis zur Weiterführung des Versuchs bei –80°C gelagert.

Zur Förderung der Freisetzung der Virionen aus den Zellen wurde die Zellsuspension anschließend dreimal für 20 sek. mit Ultraschall (Branson Sinifier 450, Branson, Danbury, USA) bei 20% der maximalen Leistung (Stufe „Control 8“) behandelt und zwischen den einzelnen Schritten auf Eis gekühlt. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde zentrifugiert (Multifuge 4KR, Heraeus, 1200 rpm, 10 min., 4°C).

Der virushaltige Überstand wurde zur Virusanreicherung auf ein Succrosekissen gegeben. Dazu wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman-Tube; 14 x 95 mm) 2 ml sterile 25% Succrose/PBS vorgelegt und vorsichtig mit dem virushaltigen Überstand überschichtet. Zum Auffüllen der Röhrchen bis zum Rand wurde HBSS verwendet. Nach einer Ultrazentrifugation (L8-70M-Ultrazentrifuge; Rotor SW 40, 24000 rpm, 2h, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und die amplikonhaltigen Pellets in 100 µl HBSS pro

Zellkulturplatte resuspendiert. Nach Aliquotierung in 50, 80 und 140 µl wurden die Amplikonvektoren zur Langzeitaufbewahrung bei –80°C gelagert.

3.6 Transduktion verschiedener Zelllinien und primärer Zellen

3.6.1 Transduktion der 293-Zellen

2×10^5 , 3×10^5 oder 1×10^6 Zellen wurden in 500 µl Medium auf eine 12-well-Platte (Corning Costar, Bodenheim) pipettiert, die gewünschte Menge an Amplikonvektor auf die Zellen gegeben und die Platte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Während der ersten Stunde der Inkubationszeit wurde die Platte zur besseren Verteilung des Amplikonvektors auf den Zellen alle 15 min. vorsichtig geschwenkt. Nach 24 h wurde die Transduktionseffizienz überprüft, indem der Anteil an GFP⁺-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 3.8) und Durchflusszytometrie (Kapitel 3.7) ermittelt wurde.

3.6.2 Transduktion lymphohämatopoetischer Zelllinien

Die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat, KG1a und K562 wurden wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben transduziert. Es wurden 2×10^5 Zellen pro Transduktionsansatz eingesetzt.

3.6.3 Transduktion hämatopoetischer CD34⁺-Stammzellen

Vor der Transduktion der primären CD34⁺-Stammzellen wurde zunächst eine Vitalitätsbestimmung mittels einer Propidiumiodid-Färbung und einer anschließenden FACS-Analyse (Kapitel 3.7.1) durchgeführt. Bei einer vorliegenden Vitalität von über 90% wurde die Transduktion wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben durchgeführt. Es wurden pro Ansatz 2×10^5 Zellen in 200 µl oder 400 µl des entsprechenden Mediums aufgenommen. Während der Transduktion und der anschließenden Kultivierung wurden die benötigten Zytokine (Tab. 2) zugegeben.

3.6.4 Transduktion mesenchymaler Stammzellen

2×10^5 Zellen wurden in einem Volumen von 500 µl des entsprechenden Mediums auf eine 24-well-Platte (Corning Costar, Bodenheim) pipettiert und bei 37°C und 5% CO₂ im

Brutschrank inkubiert. Nach einer Stunde wurden die adhärenenten Zellen der einzelnen wells nochmals mit PBS gewaschen, trypsiniert, in 3 ml DMEM ohne FGF resuspendiert und die Zellen zentrifugiert (Multifuge 4KR, Heraeus, 1400 rpm, 5 min., RT). Die Zellen der einzelnen wells wurden in 400 µl DMEM aufgenommen und auf eine 12-well-Platte (Corning Costar, Bodenheim) pipettiert. Die Transduktion der Zellen erfolgte in Suspension. Die gewünschte Menge an Amplikonvektor wurde auf die Zellen gegeben und die Platte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Während der ersten Stunde der Inkubationszeit wurde die Platte zur besseren Verteilung des Amplikonvektors auf den Zellen alle 15 min. vorsichtig geschwenkt. Nach 24 h wurde schließlich die Transduktionseffizienz überprüft, indem der Anteil an GFP+-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse ermittelt wurde.

3.7 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können verschiedene Parameter einer Zelle erfasst und in einer anschließenden FACS- (Fluorescence-activated cell sorting-) Analyse ausgewertet werden. Dies ermöglicht zum einen die Bestimmung der Zellgröße und Granularität der Zellen und zum anderen den Nachweis von Oberflächen- oder intrazellulären Molekülen nach Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern sowie den Nachweis eigenfluoreszierender Proteine (z.B. das grün-fluoreszierende Protein = GFP) und Farbstoffe in der Zelle. Die Zellen werden für die Messung einzeln an einem Argon-Laser vorbeigeleitet. Nach Anregung bei 488 nm können dann von verschiedenen Detektoren unterschiedliche Lichtemissionen jeder einzelnen Zelle erfasst werden. Dazu gehören das Vorwärtsstreulicht („forward light scatter“, FSC) als Maß für die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht („sideward light scatter“, SSC) als Maß für die intrazelluläre Granularität der Zelle und die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe im grünen (525 nm; FL1-Detektor), roten (578 nm; FL2-Detektor) oder dunkelroten Wellslängenbereich (680 nm; FL3-Detektor). Durch eine Dot-Blot-Darstellung des FSC gegen das SSC besteht die Möglichkeit, tote Zellen oder Partikel aufgrund ihrer geringeren Größe und Granularität von lebenden Zellen zu unterscheiden und somit von der Analyse bzw. Auswertung auszuschließen. Tote Zellen können auch durch Anfärben mit Propidiumiodid markiert und

von der lebenden Zellpopulation abgegrenzt werden (Kapitel 3.7.2). Als fluoreszierende Farbstoffe wurden in der vorliegenden Arbeit grün- (FITC = Flourescein-Isothiocyanat oder GFP) bzw. rot-fluoreszierende Farbstoffe (PE = Phycoerythin oder PI = Propidiumiodid) einzeln oder als Antikörperkonjugate verwendet.

3.7.1 FACS-Analyse

Zur FACS-Analyse wurden adhärent wachsende Zellen mit Trypsin abgelöst (Kapitel 3.4.1) und in ein FACS-Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) überführt; Suspensionszellen wurden nach der Resuspendierung direkt in ein FACS-Röhrchen gegeben. In der Regel wurde die Hälfte des Transduktionsansatzes für die FACS-Analyse verwendet. Die Zellen wurden in 1 ml PBS gewaschen und das Sediment nach der Zentrifugation (Multifuge 4KR, Heraeus, 1400 rpm, 5 min., RT) zur Antikörperfärbung (Kapitel 3.7.2) in 100 µl PBS bzw. zum Nachweis von GFP⁺-Zellen ohne Antikörperfärbung zur direkten Fixierung in 1 ml Fixierungslösung (2% (w/v) Paraformaldehyd in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS) resuspendiert. Nach der Fixierung bei 4°C für 20 min. wurden die Zellen zentrifugiert (s.o.). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Sediment in 300 µl PBS aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit einem FACScan oder FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Zur Datenerfassung wurden 5000 bis 10000 Ereignisse aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm „CellQuest, Version 3.3.“ (Becton Dickinson, Heidelberg).

3.7.2 Antikörper- und Propidiumiodid-Färbung

Zur Anfärbung von Oberflächenmolekülen wurden Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)- oder Phycoerythin (PE)-markierte Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg) (Tab. 3) gegen das nachzuweisende Molekül eingesetzt. Der Antikörper wurde zur Zellsuspension gegeben, der Ansatz gut gemischt und für 15 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, fixiert und eine FACS-Analyse durchgeführt (Kapitel 3.7.1). Zur Anfärbung von toten Zellen wurde Propidiumiodid (PI, Sigma) in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zu den fixierten

Zellen gegeben. Die Färbemethode basiert darauf, dass nur die Membran toter Zellen durchlässig für PI ist und es somit ausschließlich mit DNA toter Zellen interkaliert.

monoklonale fluoreszenzmarkierte Antikörper	eingesetzte Menge pro Ansatz
anti-humanes IgG1 mit PE (50 µg/ml)	5 µl
anti-humanes IgG1 mit FITC (50 µg/ml)	5 µl
anti-humanes CD34 mit PE	5 µl
anti-humanes CD34 mit FITC	5 µl

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörper und die eingesetzte Menge an Antikörpern pro gefärbtem Ansatz.

3.8 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Überprüfung, ob eine Transfektion oder Transduktion erfolgreich war, wurde die GFP-Expression der transfizierten bzw. transduzierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch beurteilt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein inverses Durchlichtmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen) mit einer Quecksilberlampe und einem 470 nm-Filter verwendet.

3.9 Einzelzellklonierung

Die Einzelzellklonierung wurde mit der humanen 293 Nierenzelllinie 24 bis 48 h nach der Transduktion der Zellen durchgeführt. Es wurden je drei oder fünf Zellen in 100 µl Medium auf eine 96-well-Platte (Corning Costar, Bodenheim) pipettiert, was statistisch, wie in unseren Vorversuchen gezeigt wurde, zum Anwachsen eines Einzelzellklons pro well führen kann. Von jedem Ansatz wurden acht 96-well Platten angelegt. Die Auswertung der Klonierung erfolgte in der 3./4. Woche nach der Klonierung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. GFP⁺-Klone wurden expandiert, indem sie zunächst auf 24-well-Platten überführt und dann weiterkultiviert wurden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung von helfervirusfreien HSV-1-Amplikonvektoren

In den Anfängen der Herstellung von HSV-Amplikonvektoren wurden replikationsdefekte HSV-1-Helferviren verwendet. Eine wesentliche Verbesserung dieser Methode gelang durch die Technik, große DNA-Fragmente als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) zu klonieren. Durch die Klonierung des großen HSV-1-Genoms als BAC, welches durch die Deletion des HSV-Verpackungssignals und des essentiellen Gens IE 2 nicht zur eigenständigen Vermehrung fähig ist (Saeki et al., 1998), entsteht ein Konstrukt, welches alle erforderlichen HSV-1-Proteine in *trans* bereitstellt. Es ermöglicht somit die Verpackung von Amplikonvektoren ohne die ansonsten unvermeidbare Koexistenz von Helferviren in der Vektorpräparation und führt dadurch zu einer deutlichen Reduktion der vektorbedingten Zytotoxizität.

4.1.1 Vergleich der Ausbeute an BAC-Plasmid-supercoil- und BAC-Plasmid-relaxed-circle-Form

An die Isolierung des BAC-Plasmids werden besondere Herausforderungen gestellt. Da bei der Replikation des mit rund 150 kb besonders großen BAC-Plasmids im Verhältnis zu kleineren Plasmiden nur geringe Plasmidausbeuten erzielt werden können, wird die BAC-Plasmidpräparation (Kapitel 3.2.2.1) mit großen Mengen an *E. coli*-Bakterienkultur (über vier Liter pro Präparation) durchgeführt. Nach der BAC-Plasmidpräparation aus *E. coli* wird zur weiteren Reinigung und Isolierung der BAC-Plasmid-supercoil (sc) bzw. BAC-Plasmid-relaxed-circle (rc)-Form eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation der extrahierten DNA durchgeführt. Cornel Fraefel, einer der Erstbeschreiber für die Herstellung von HSV-Amplikonvektoren, sieht die Verwendung der BAC-sc-Form vor, die durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation von der BAC-rc-Form getrennt werden kann. Für den Vergleich der Ausbeute an BAC-sc- zur BAC-rc-Form wurden vier BAC-Plasmidpräparationen nach Standardverfahren durchgeführt und die jeweilige Ausbeute der beiden Formen bestimmt. Dabei zeigte sich (Abb. 7), dass die Ausbeute an der BAC-rc-

Form im Mittel um den Faktor zwei bis drei höher war als die Ausbeute an der BAC-sc-Form, auch wenn während der Präparation weitestgehend Scherkräfte, die zu einer Überführung der BAC-sc- in die BAC-rc-Form führen, vermieden wurden. Da die geringe Menge an BAC-sc-Form zu einem erhöhten zeitlichen Aufwand bei der Plasmidpräparation ausreichender Mengen an BAC-Plasmid führt, wurde im folgenden Versuch zunächst die Transduktionseffizienz nach Transfektion mit der BAC-sc- und der BAC-rc-Form getestet.

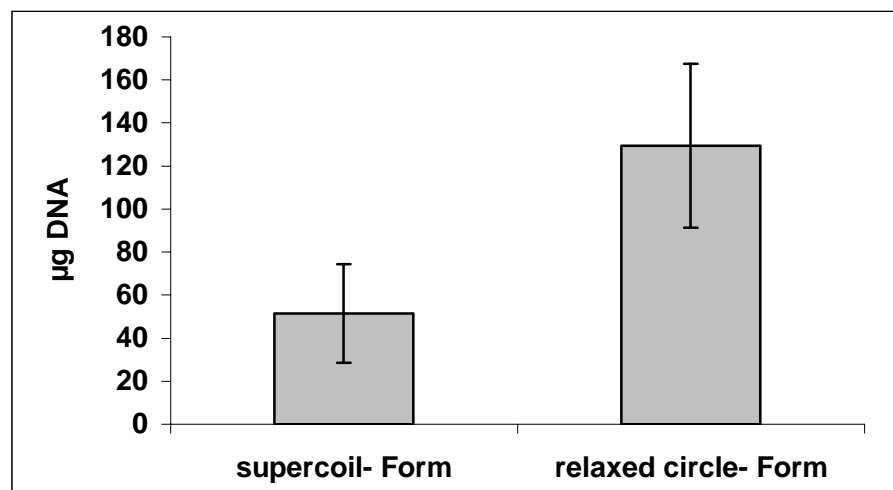


Abb. 7: Ausbeute an der BAC-Plasmid-supercoil- bzw. BAC-Plasmid-relaxed-circle-Form nach Reinigung durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation. Mittelwert und Standardabweichung (SD) der DNA-Ausbeuten aus je 4 Litern *E. coli*-Kultur sind dargestellt (n=4).

4.1.2 Vergleich der Transduktionseffizienz nach Transfektion mit der BAC-Plasmid-supercoil- und der BAC-Plasmid-relaxed-circle-Form

In dieser Arbeit wurden der HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und der HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV verwendet. Während bei dem HSV-1-Standardamplikonvektor, der sein Genom und das Transgen nicht in das Genom der Wirtszelle integrieren kann, die Dauer der Transgenexpression nach Infektion der Zielzellen in der Regel auf einige Tage bis Wochen begrenzt ist, besteht das Prinzip des HSV/AAV-Hybridamplikonvektors HSV/AAV darin, die Stabilität des Transgens durch genomische Integration zu erhöhen.

Es sollte zunächst bestimmt werden, ob die sc-Form des BAC-Plasmids mit gleicher Effizienz wie die rc-Form für die Verpackung der beiden Vektoren verwendet werden kann, was eine wesentliche Vereinfachung der Vektorherstellung darstellen würde (s.o.).

Da die verwendeten Vektoren sich nicht replizieren können, und daher die Zahl der infektiösen Partikel bei helfervirusfreien Amplikonvektoren, – unabhängig davon, ob sie den HSV-1-Standardamplikonvektoren oder den HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren angehören – nicht durch übliche virologische Standardverfahren wie z.B. den Plaque-Test bestimmt werden kann, wurde der Vergleich der Anzahl an infizierten Zellen indirekt anhand der Transduktionseffizienz (transduction unit), z.B. als Vergleich der Transgen-(GFP-)expression bei 50% der Zellen (t_{50}), vorgenommen. Die Verpackung der HSV-Amplikonvektoren wurde wie in Kapitel 3.5 beschrieben durchgeführt. Die humane T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat wurde mit den hergestellten Amplikonvektoren transduziert und 24 h nach der Transduktion die Transduktionseffizienz anhand des vom Amplikonvektor kodierten Markergens GFP in Prozent der Gesamtzellzahl bestimmt. Die Toxizität des Vektors wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) erfasst.

Zur Erläuterung der Auswertung einer FACS-Analyse ist in Abb. 8 das Ergebnis einer FACS-Analyse dargestellt. In den beiden linken Abbildungen ist der Anteil an nicht transduzierten und transduzierten Zellen im „Lebendgate“ (umrandet) gezeigt. Die Zellen innerhalb des „Lebendgates“ stellen die vitalen Zellen dar. Bei den Zellen außerhalb des „Lebendgates“ handelt es sich um tote Zellen. Die Toxizität des Vektors in den transduzierten Zielzellen wird durch den Vergleich der Zellzahl innerhalb des „Lebendgates“ vor und nach der Transduktion der Zielzellen bestimmt. Beim vorliegenden Beispiel beträgt die Toxizität 0%. In den beiden rechten Abbildungen sind die GFP+-Ereignisse (GFP+-Zellen) gezeigt. Die nicht transduzierten Zellen zeigen eine Transduktionseffizienz (GFP-Expression) von 0%, während bei den transduzierten Zellen 56% der Zellen GFP+ sind.

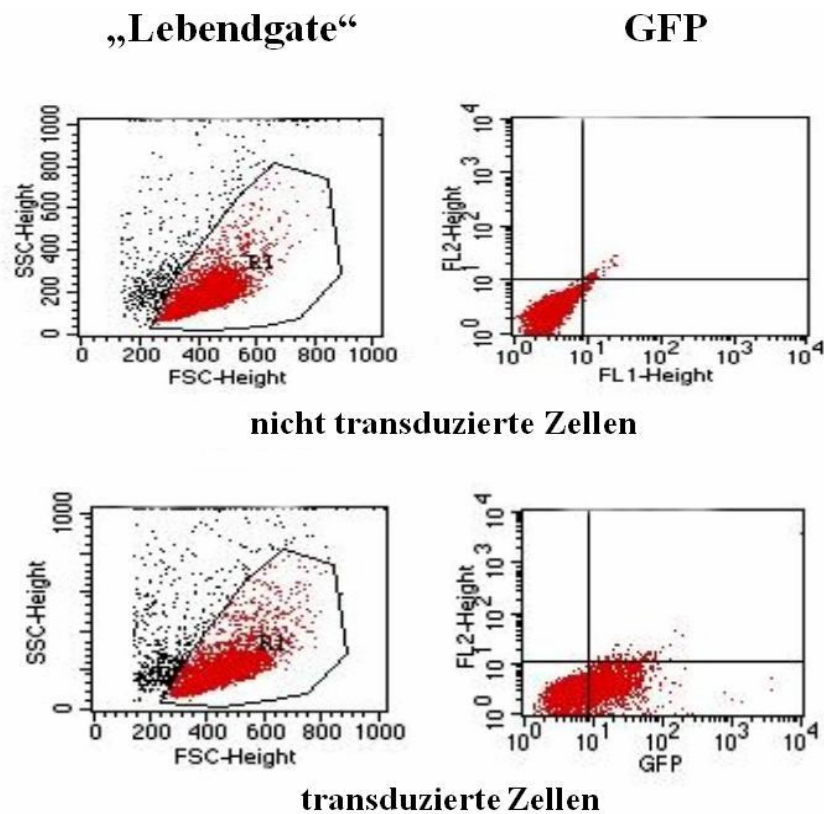


Abb. 8: Durchflußzytometrische Bestimmung der Transduktionseffizienz und der Toxizität. Die Transduktionseffizienz und die Toxizität nach Transduktion der humanen T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV ist gezeigt. Die beiden oberen Abbildungen zeigen die Zellen im nicht transduzierten Zustand, die beiden unteren Abbildungen 24 h nach Transduktion mit dem Vektor. In den beiden linken Abbildungen ist der Anteil an vitalen Zellen im „Lebendgate“ (umrandet) durch eine FSC gegen SSC Darstellung gezeigt. In den beiden rechten Abbildungen ist die Anzahl an GFP+-Ereignissen (GFP+-Zellen) gezeigt.

In mehreren Ansätzen wurden unter identischen Bedingungen HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren hergestellt, wobei entweder die BAC-sc- oder die BAC-rc-Form verwendet wurde. Für den Vergleich wurden gleiche Mengen (Vol.) der jeweiligen Vektorpräparation benutzt.

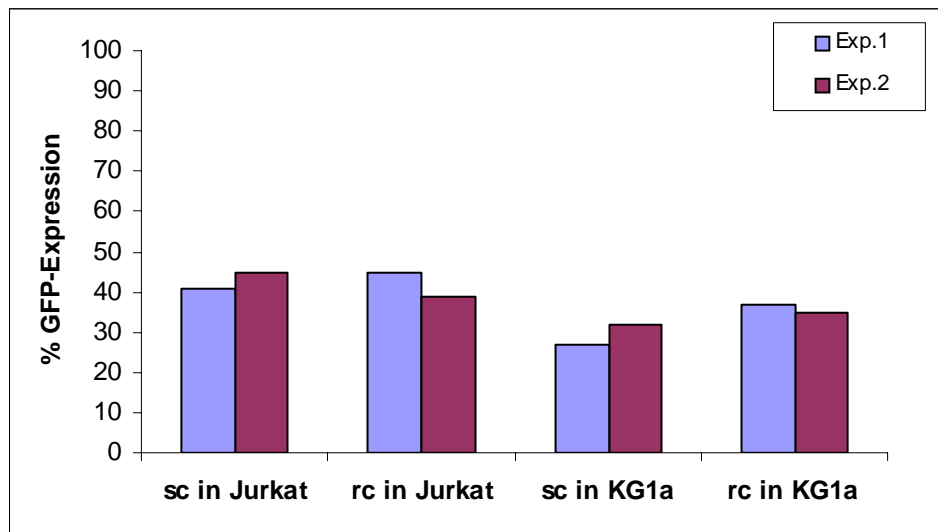


Abb. 9: Vergleich der Transduktionseffizienz nach Verwendung der BAC-sc- bzw. BAC-rc-Form zur Vektorherstellung. Der HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wurde unter ansonsten gleichen Bedingungen entweder unter Verwendung der BAC-sc- oder BAC-rc-Form hergestellt. Die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a wurden mit jeweils 80 µl des hergestellten Vektors transduziert und 24 h später die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Es zeigte sich, dass die erzielte Transduktionseffizienz unter Verwendung der BAC-sc- bzw. BAC-rc-Form bei der Vektorherstellung in beiden Zelllinien nahezu identisch war (Abb.9). Auch bei der Zielzelltoxizität zeigten sich in dieser Hinsicht keine signifikanten Unterschiede (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis konnte auch nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV bestätigt werden. In allen weiteren Experimenten wurde daher aufgrund eines geringeren zeitlichen Aufwands bei der Plasmidpräparation ein Gemisch der BAC-sc- und BAC-rc-Form verwendet.

4.1.3 Einfluss des PLUSTM-Reagenz bei der Herstellung der HSV-1-Amplikonvektoren

Durch die Zugabe des kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenz PLUSTM zur Unterstützung des Lipofektamins bei der Transfektion wird eine Verkürzung der Transfektionsdauer von 5,5 h auf 4 h ermöglicht. Um diesen Vorteil auch in dieser Arbeit nutzen zu können, sollte zunächst der Einfluss des PLUSTM-Reagenz auf die Transduktionseffizienz untersucht werden. Dazu wurde der HSV/AAV-

Hybridamplikonvektor HSV/AAV mit bzw. ohne Zugabe des Transfektionsreagenz unter ansonsten identischen Bedingungen hergestellt. Die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a wurden mit identischen Mengen des hergestellten Vektors transduziert und die Transduktionseffizienz nach 24 h bestimmt.

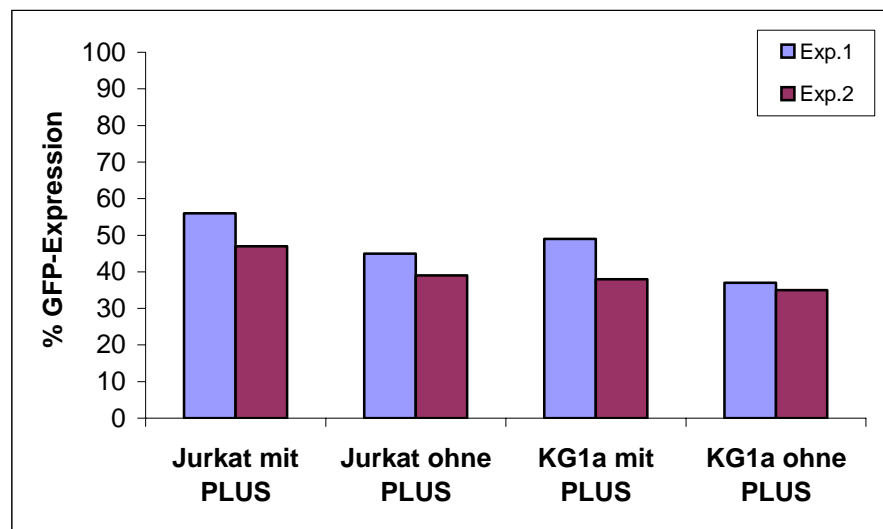


Abb. 10: Vergleich der Transduktionseffizienz nach Zugabe des PLUSTM-Reagenz während der Vektorherstellung. Der HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wurde unter ansonsten gleichen Bedingungen entweder mit oder ohne PLUSTM-Reagenz hergestellt. Die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a wurden mit jeweils 80 µl des hergestellten Vektors transduziert und 24 h später die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Wie in Abb. 10 dargestellt, kann durch die Zugabe der PLUSTM-Reagenz neben einer um 1,5 h verkürzten Transfektionsdauer auch eine Erhöhung der Transduktionseffizienz erreicht werden. Die Toxizität der Vektoren in den transduzierten Zellen wird nicht beeinflusst (nicht gezeigt). Bei den folgenden Vektorherstellungen wurde aufgrund dieses Ergebnisses das PLUSTM-Reagenz eingesetzt.

4.2 Optimierung der einzusetzenden Vektormenge für eine Transduktion von lymphohämatopoetischen Zelllinien

Für die weiteren Experimente sollten im Anschluss optimale Bedingungen für die Transduktion von lymphohämatopoetischen Zelllinien ermittelt werden. Daher wurde die Vektormenge (Vol.) für eine Transduktion von lymphohämatopoetischen Zelllinien der

Vektorpräparationen optimiert. Es wurde wie in Kapitel 4.1.3 die humane T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat transduziert. Auch die humane myeloische Leukämiezelllinie KG1a wurde verwendet, da diese als stammzellnahe lymphohämatopoetische Zelllinie als Model für primäre Stammzellen eingesetzt werden kann. Als Vergleichszelllinie im Hinblick auf unsere Experimente wurde die humane embryonale Nierenzelllinie 293 transduziert, die von Heister et al. (Heister et al., 2002) für Untersuchungen zum HSV/AAV-Hybridsystem verwendet wurde. Es wurden jeweils 2×10^5 Zellen mit steigenden Mengen des HSV-1-Standardamplikonvektors HSV transduziert. Die GFP-Expression und die zelluläre Toxizität wurden 24 h später mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

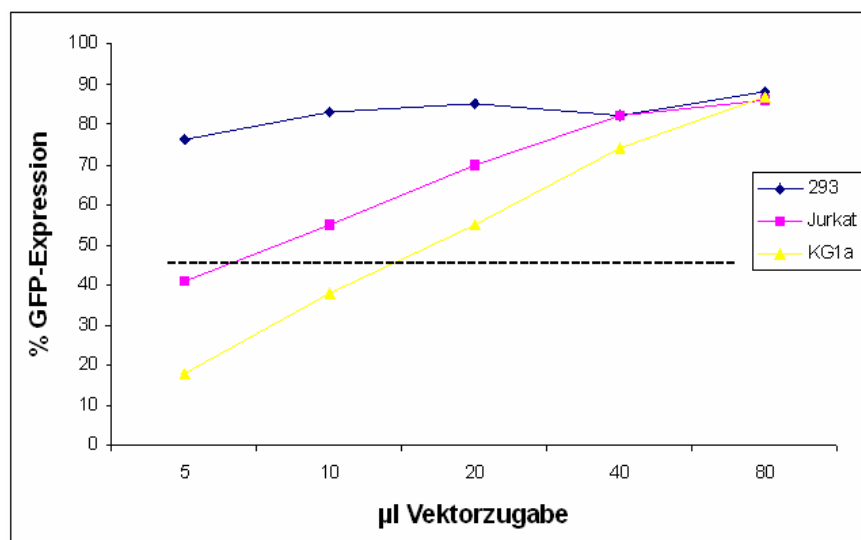


Abb. 11: Vergleich der Transduktionseffizienz nach Transduktion mit unterschiedlichen Vektormengen. Die humane embryonale Nierenzelllinie 293 und die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a wurden mit jeweils 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl und 80 µl des HSV-1-Standardamplikonvektors HSV transduziert und 24 h später die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist eins von zwei Experimenten. Die gestrichelte Linie stellt die Transgen- (GFP-)expression bei 50% der Zellen (t_{50}) dar.

In beiden lymphohämatopoetischen Zelllinien wird durch die Erhöhung der Vektormenge eine Zunahme der Transduktionseffizienz erreicht (Abb. 11). Vergleicht man dabei den t_{50} -Wert, also den Wert, bei dem eine Transduzierbarkeit von 50% der Zielzellen erreicht wird, so zeigt sich, dass dieser Wert nach Transduktion der Jurkat-Zellen mit 10 µl Vektor

erreicht wird, während bei den KG1a-Zellen die doppelte Menge an Vektor eingesetzt werden muss. In beiden Zelllinien wird unabhängig davon nach Transduktion mit 80 μ l Vektor eine Plateau-Phase mit einer GFP-Expression von ca. 85% erreicht, so dass auch nach Transduktion mit weiter steigenden Vektormengen keine Steigerung der Transduktionseffizienz mehr erreicht wird (nicht gezeigt). Im Unterschied zu den lymphohämatopoetischen Zelllinien kann in der 293-Zelllinie bereits mit Vektormengen von 5 μ l annähernd die Plateau-Phase erreicht werden, die nach Transduktion mit steigenden Vektormengen nur unwesentlich ansteigt. Nach Transduktion der Zielzellen mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wurden analoge Ergebnisse erreicht (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den zuvor beobachteten mit der Vektormenge ansteigenden Transduktionseffizienzen steigt die Toxizität mit Zunahme der Vektormenge in allen drei Zelllinien annähernd identisch an (Abb. 12). Die Untersuchungen wurden auch mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wiederholt und analoge Ergebnisse erreicht (nicht gezeigt).

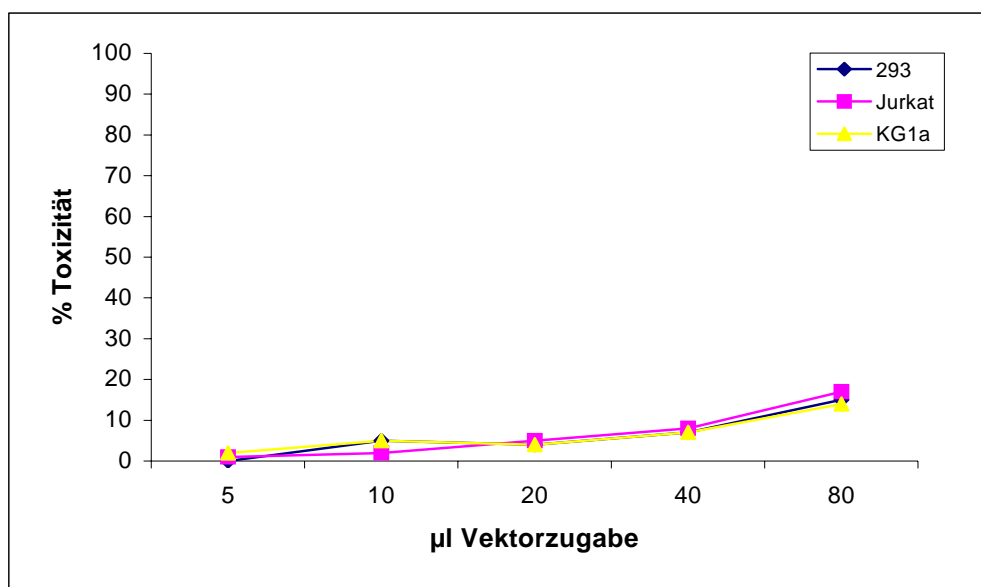


Abb. 12: Vergleich der prozentualen Toxizität nach Transduktion mit unterschiedlichen Vektormengen. Die humane embryonale Nierenzelllinie 293 und die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a wurden mit jeweils 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l und 80 μ l des HSV-1-Standardamplikonvektors HSV transduziert und 24 h später die Toxizität mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist eins von zwei Experimenten.

4.3 Vergleich der Transduktionseffizienz und der Toxizität zwischen dem HSV-1-Standardamplikonvektor und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor

In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass der HSV-1-Standardamplikonvektor HSV, der keine Anteile der AAV enthält und somit nur eine transiente Transgenexpression ermöglicht, lymphohämatopoetische Zellen mit einer Effizienz von 35% transduziert (Müller, 2004). Nun sollte geklärt werden, ob diese Effizienz auch nach Transduktion von lymphohämatopoetischen Zellen mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV erreicht werden kann. HSV/AAV wurde parallel zu HSV unter identischen Bedingungen hergestellt. Die humane T- Zell-Leukämiezelllinie Jurkat wurde anschließend mit unterschiedlichen Vektormengen von HSV und HSV/AAV transduziert und die Transduktionseffizienz 24 h später mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In Abb. 13 sind die GFP+-Zellen im Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Bei dieser Form der Auswertung sind jedoch nur Schätzwerte bzgl. der Anzahl an GFP+-Zellen möglich.

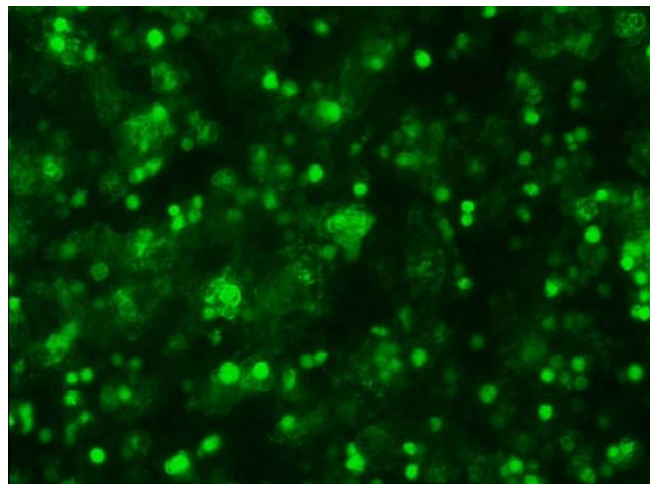


Abb. 13: GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der GFP-Expression der humanen T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat 24 h nach Transduktion mit 80 µl des HSV/AAV-Hybridamplikonvektors HSV/AAV.

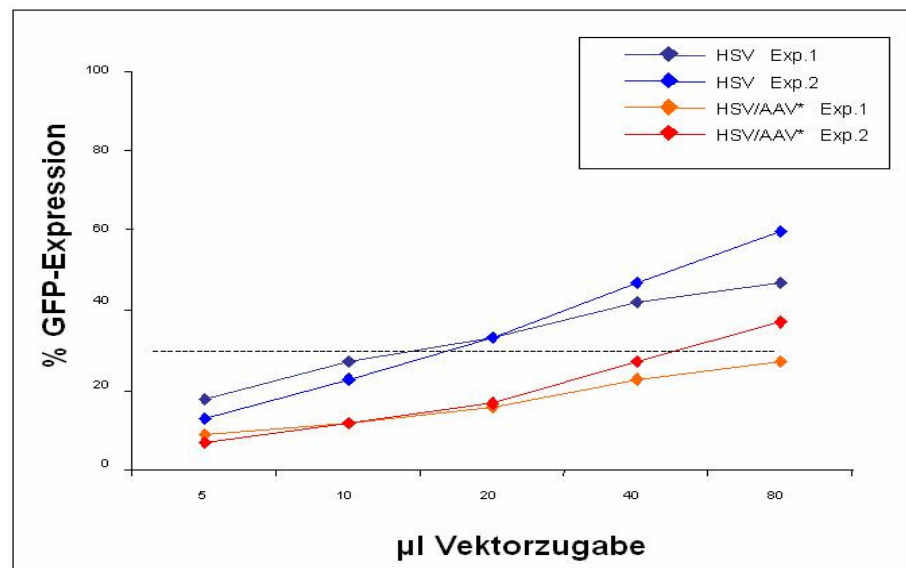


Abb. 14: Vergleich der Transduktionseffizienz nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV. Die humane T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat wurde mit jeweils 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl und 80 µl des identisch hergestellten Vektorstocks transduziert und 24 h später die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die gestrichelte Linie stellt die Transduzierbarkeit von 30% der Zellen (t₃₀) da.

Der Vergleich der Transduktionseffizienzen des HSV-1-Standardamplikonvektors HSV und des HSV/AAV-Hybridamplikonvektors HSV/AAV zeigt (Abb. 14), dass unabhängig von der Vektormenge die Transduktionseffizienz nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor einen zwei- bis dreifach höheren Wert erreicht als nach Transduktion mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang den Wert der 30%-igen Transduzierbarkeit (t₃₀), so zeigt sich, dass dieser Wert bereits nach Transduktion der Zellen mit 10 µl des HSV-1-Standardamplikonvektors HSV erreicht wird, während 40 bis 80 µl des HSV/AAV-Hybridamplikonvektors HSV/AAV benötigt werden, um den entsprechenden Wert zu erreichen. Um mit beiden Vektoren eine gleiche Transduktionseffizienz zu erreichen, muß demnach acht- bis zehnmals soviel Hybridamplikonvektor eingesetzt werden wie beim Standardamplikonvektor.

Nach einer Transduktion mit 80 µl Vektor wird mit beiden Vektoren die höchste Transduktionseffizienz erzielt.

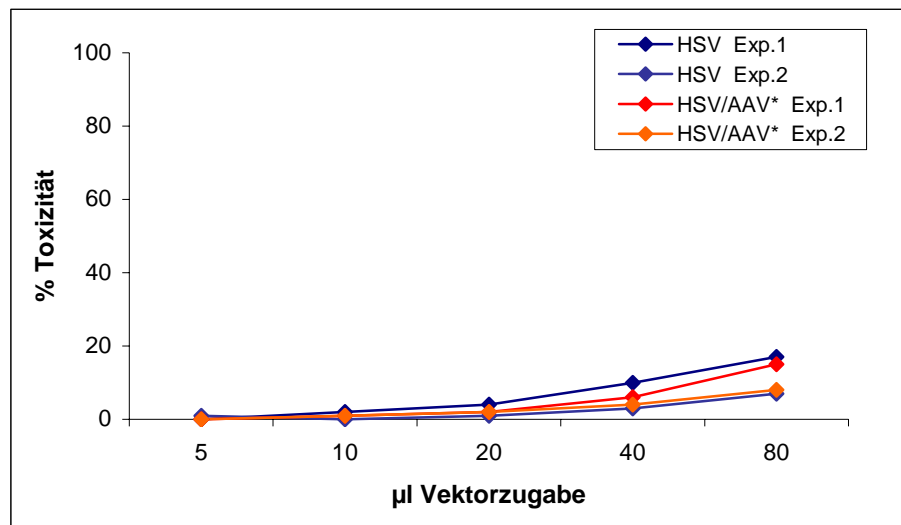


Abb. 15: Vergleich der prozentualen Toxizität nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV. Die humane T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat wurde mit jeweils 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl und 80 µl der identisch hergestellten Vektorpräparationen transduziert und 24 h später die Toxizität mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Im Gegensatz zur Transduktionseffizienz zeigen sich beim Vergleich der prozentualen Toxizität nach der Transduktion keine signifikanten Unterschiede (Abb. 15). Die Toxizität von 20% ist für gentherapeutische Anwendungen tolerierbar.

Für die weiteren Transduktionsversuche wurden aufgrund dieser Versuchsergebnisse unabhängig von der Zelllinie jeweils 2×10^5 Zellen mit den hier angegebenen Vektormengen transduziert.

4.4 Transduktion lymphohämatopoetischer Zelllinien

4.4.1 Vergleich der Transduktionseffizienz und der Toxizität 24 h nach der Transduktion

Da sich humane hämatopoetische CD34+-Stammzellen nur schwer gewinnen lassen, wurden vor der Transduktion dieser Zellen zunächst Vorversuche durchgeführt. Es wurden neben den bereits in den vorherigen Versuchen verwendeten lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a auch die lymphohämatopoetische Zelllinie K562 transduziert,

wobei alle Zelllinien unterschiedlichen Reihen der Hämatopoese entsprechen. Bei der humanen myeloischen Leukämiezelllinie KG1a handelt es sich um die stammzellnächste Linie, die somit als Modell für die primären Stammzellen eingesetzt werden kann. Zur Kontrolle wurde wiederum die humane embryonale Nierenzelllinie 293 verwendet.

Die vier Zelllinien wurden mit 80 µl HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduziert und die Transduktionseffizienz und Toxizität 24 h nach der Transduktion mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

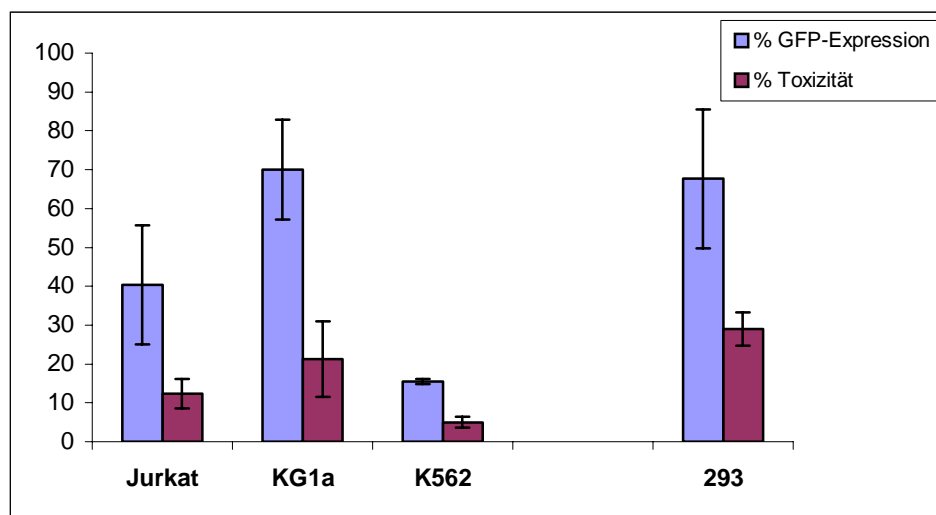


Abb. 16: Vergleich der GFP-Expression und der prozentualen Toxizität 24 h nach Transduktion mit 80 µl HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV. Es wurden die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat, KG1a und K562 sowie als Vergleichszelllinie die humane embryonale Nierenzelllinie 293 transduziert. Mittelwert und SD sind dargestellt (n=2-4).

Wie in Abb. 16 dargestellt, zeigt die Transduktionseffizienz nach Transduktion der lymphohämatopoetischen Zelllinien KG1a und Jurkat im Vergleich zu der humanen Nierenzelllinie 293 keine signifikanten Unterschiede. Auch die Toxizität ist im Vergleich dieser Zelllinien nicht signifikant verschieden. Eine Ausnahme stellt in diesem Zusammenhang die K562 Zelllinie dar, in der neben der Transduktionseffizienz auch die Toxizität die niedrigsten Werte erreicht. Dieses Ergebnis wurde in allen vier transduzierten Zelllinien auch nach Transduktion mit 140 µl HSV/AAV statt 80 µl HSV/AAV erzielt. Eine Steigerung der Transduktionseffizienz konnte durch eine größere Vektormenge bei

keiner Zelllinie erzielt werden, da nach Transduktion mit 80 µl Vektor bereits die Plateau-Phase der Transduktionseffizienz erreicht ist (Kapitel 4.2).

Für die Vorversuche zur Transduktion von CD34+-Stammzellen wurden im weiteren Verlauf der Arbeit aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a verwendet.

4.4.2 Vergleich der Transgenexpression und der Toxizität im Zeitverlauf

Um eine stabile Transgenexpression nachweisen zu können, müssen die Expression des Transgens GFP und die Toxizität über einen längeren Zeitraum nach der Transduktion beobachtet werden. Aufgrund der in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Transduktionseffizienz und Toxizität 24 h nach der Transduktion wurden für diesen Versuch die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a und als Kontrollzelllinie die humane embryonale Nierenzelllinie 293 ausgewählt. Die Zelllinien wurden mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV sowie dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduziert und die Transgenexpression über einen Zeitraum von 91 Tagen untersucht. Um gleiche Ausgangsvoraussetzungen bzgl. der Transduktionseffizienz zu erhalten, wurde die Transduktion aufgrund der in Kapitel 4.3 beschriebenen Ergebnisse mit 10 µl HSV-1-Standardamplikonvektor und 80 µl HSV/AAV-Hybridamplikonvektor durchgeführt.

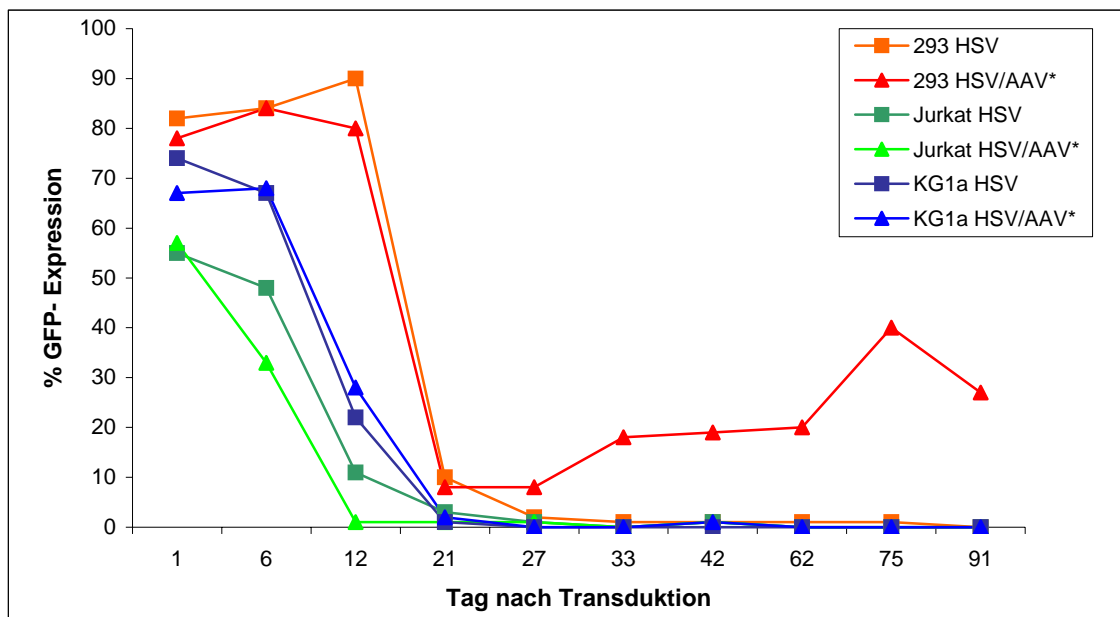


Abb. 17: Vergleich der GFP-Expression über einen Zeitraum von 91 Tagen nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV. Es wurden die lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a sowie die humane embryonale Nierenzelllinie 293 transduziert. Die Transduktion erfolgte mit 10 µl HSV und 80 µl HSV/AAV.

In Abb. 17 ist die Transgenexpression in verschiedenen transduzierten Zelllinien im Zeitverlauf dargestellt. In Bezug auf die Transduktionseffizienz wird deutlich, dass diese 24 h nach Transduktion der lymphohämatopoetischen Zelllinien unabhängig vom Vektor niedrigere Werte erreicht als nach Transduktion der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293. In der 293 Zelllinie ist im weiteren Zeitverlauf eine Zunahme der Transgenexpression von Tag 1 bis Tag 12 nach Transduktion mit HSV und von Tag 1 bis Tag 6 nach Transduktion mit HSV/AAV zu erkennen, bei allen anderen Ansätzen wird der höchste Wert an Tag 1 erreicht. Im Vergleich der beiden lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a zeigt sich, dass im Zeitraum vom 1. bis zum 6. Tag nach der Transduktion der Jurkat-Zellen ein deutlicher Verlust der Transgenexpression vorliegt, während in den KG1a-Zellen nach Transduktion mit HSV und HSV/AAV bis zum 6. Tag nahezu ein Plateau vorliegt. Dieser Verlauf lässt sich auf die zweimal höhere Zellteilungsrate der Jurkat-Zelllinie im Vergleich zur KG1a-Zelllinie zurückführen, die einen schnelleren Verlust des Vektors in den ersten Tagen nach der Transduktion mit sich bringt. Obwohl die Transgenexpression bei den lymphohämatopoetischen Zelllinien Jurkat und KG1a bereits

ab dem 6. Tag nach der Transduktion abnimmt und am 21. Tag in allen Ansätzen mit Ausnahme des Transduktionsansatzes Jurkat HSV nur noch bei $< 2\%$ liegt, kann bis zum 12. Tag nach der Transduktion eine Transgenexpression von 10 bis 20% erzielt werden. Dies lässt sich auf die Besonderheit des HSV-Systems bei der DNA-Replikation zurückführen, bei der durch den „rollende Replikationsmechanismus“ (Abb. 3) die Einschleusung vieler Kopien des genetischen Materials in die Zielzellen durch die Viruspartikel ermöglicht wird, so dass auch bei hohen Zellteilungsraten viele transgentragende Plasmide an die Tochterzellen weitergegeben werden können. Somit kann aufgrund der multiplen Episome auch ohne Integration des Transgens ins Genom der Wirtszelle eine Transgenexpression bis zu zwei Wochen nach der Transduktion erreicht werden. Die Transgenexpression in den 293-Zellen ist nach Transduktion mit HSV und HSV/AAV bis zum 15. Tag konstant. Am Tag 21 liegen die Werte im Vergleich zu den lymphohämatopoetischen Zelllinien in beiden Ansätzen der transduzierten 293-Zellen noch bei über 5%. Während die GFP-Expression sowohl bei den Jurkat- und den KG1a-Zellen als auch bei den mit HSV transduzierten 293-Zellen ab diesem Zeitpunkt auf unter 1 bis 2% abfällt, zeigen die mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduzierten 293-Zellen eine Zunahme der Transgenexpression. Am 91. Tag nach der Transduktion liegt die Transgenexpression in den 293-Zellen nach Transduktion mit HSV/AAV bei 27%. Dieses Ergebnis lässt eine Integration des Transgens in das Genom der 293-Zellen vermuten.

Für den Verlust der Transgenexpression sind verschiedene Ursachen möglich. Eine Möglichkeit ist die sog. Soforttoxizität, welche durch eine zu hohe Vektormenge bei der Transduktion entsteht und zu einem sofortigen Absterben der transduzierten Zellen führt, wie es bei den Jurkat-Zellen der Fall zu sein scheint. Eine weitere denkbare Erklärung ist der Verlust des transgentragenden Plasmids aufgrund einer hohen Proliferationsrate. In diesem Fall tritt der Verlust der Transgenexpression erst zu einem späteren Zeitpunkt nach der Transduktion auf, da in der Regel multiple Episome in den Zellen vorliegen, die zunächst noch an die Tochterzellen weitergegeben werden. Die dritte mögliche Ursache

liegt in einer langsameren Proliferation der transduzierten Zellen im Verhältnis zu den nicht transduzierten Zellen.

Um die Abnahme der Transgenexpression der 293-Zellen in den ersten drei Wochen nach der Transduktion genauer beurteilen zu können, wurde in einem zweiten Experiment die Anzahl an vitalen GFP+-293-Zellen ermittelt. Die Transduktion der 293-Zellen erfolgte entsprechend den vorherigen Versuchen in einem Verhältnis von 1:8 bis 1:10 mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV. Am 1. und 19. Tag nach der Transduktion wurden sowohl die Zellzahl als auch die Transgenexpression und die Toxizität mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Aus diesen Werten wurde die absolute Zellzahl an vitalen GFP+-Zellen bestimmt.

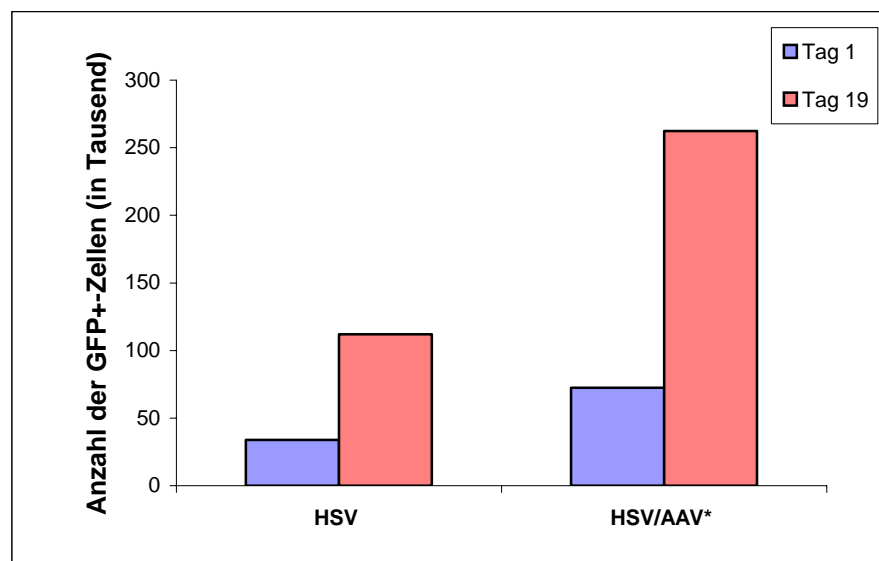


Abb. 18: Darstellung der absoluten Zellzahl an vitalen GFP+-Zellen vom 1. und 19. Tag nach der Transduktion. Die humane embryonale Nierenzelllinie 293 wurde mit 5 µl HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und mit 50 µl HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduziert.

Sowohl nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV als auch nach Transduktion mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV nimmt die absolute Zellzahl an vitalen GFP+-Zellen vom 1. bis zum 19. Tag nach der Transduktion zu (Abb. 18). Im Vergleich der beiden Vektoren wird nach Transduktion mit dem HSV/AAV an Tag 19 eine höhere Zellzahl an lebenden GFP+-Zellen erreicht. Die Abnahme der

Transgenexpression in Bezug auf die Gesamtzellzahl wie sie beispielsweise in Abb. 17 dargestellt ist, lässt sich darauf zurückführen, dass die Zellzahl an GFP⁺-Zellen bei einer Transduktionseffizienz von 20 bis 40% niedriger ist als die Zellzahl an GFP⁻-Zellen. Durch ein exponentielles Zellwachstum kommt es zu einer ungleichen Verteilung der Zellen. Trotz einer Zunahme der Anzahl an vitalen GFP⁺-Zellen kommt es somit bei Betrachtung der Gesamtzellzahl zu einer „scheinbaren“ Abnahme der GFP⁺-Zellen.

Um im Weiteren eine stabile Integration des Transgens in das Genom der Wirtszelle mit Hilfe des HSV/AAV-Hybridamplikonvektors HSV/AAV nachweisen zu können, wurde aufgrund der langanhaltenden Transgenexpression (Abb. 17) zunächst die humane embryonale Nierenzelllinie 293 verwendet.

4.5 Semiquantitativer Nachweis der AAV-Rep-Expression nach Transduktion mit HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren

Im Unterschied zu dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV[#], welcher von Heister et al. (Heister et al., 2002) zum Nachweis einer stabilen Integration in 293-Zellen verwendet wurde, hat der in dieser Arbeit verwendete HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV eine Punktmutation am Translationsstartcodon des AAV-Rep-Gens (ATG → ACG). Diese Punktmutation wurde in dem Versuch vorgenommen eine niedrigere Expression von Rep zu erhalten und dadurch die Rep-bedingte Toxizität des HSV/AAV-Hybridamplikonvektors HSV/AAV[#] zu minimieren.

Zum Nachweis einer Rep-Expression wurde die humane embryonale Nierenzelllinie 293 analog zu Kapitel 4.4.2 transduziert, 24 h später die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt und anschließend eine RT-PCR (Kapitel 3.3.2.2) durchgeführt.

Als Negativkontrollen wurden zum einen nicht transduzierte 293-Zellen verwendet und zum anderen 293-Zellen, die mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV transduziert wurden.

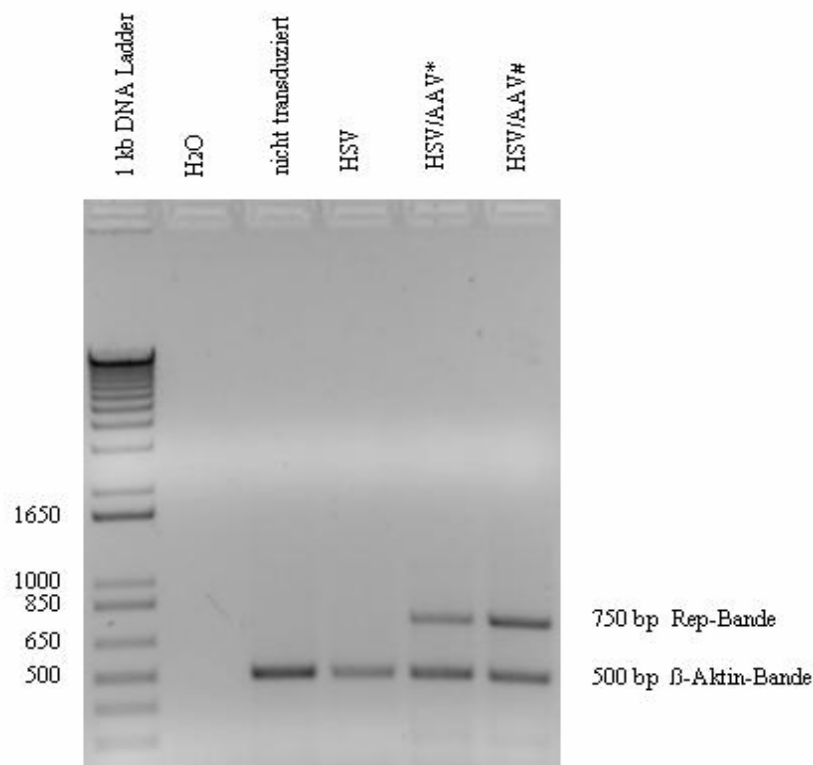


Abb. 19: Semiquantitativer Nachweis von AAV-Rep in 293-Zellen 24 h nach der Transduktion mittels RT-PCR. Dargestellt ist ein Ansatz ohne Zellen (H₂O), ein Ansatz mit nicht transduzierten 293-Zellen, ein Ansatz nach Transduktion mit 40 µl HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und die beiden Ansätze nach Transduktion mit den HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren HSV/AAV und HSV/AAV#.

Während sich bei dem Ansatz mit reinem H₂O keinerlei PCR-Produkte nachweisen lassen, lässt sich in den anderen vier Ansätzen jeweils eine deutliche β-Aktin-Bande detektieren. Die AAV-Rep-Bande von 750 bp stellt sich nur in den Ansätzen nach Transduktion mit den HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren dar. Somit ist nach Transduktion mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV trotz der Punktmutation im Rep-Translationsstartcodon eine Rep-Expression in den Zielzellen vorhanden.

Beim semiquantitativen Vergleich der Intensität der AAV-Rep-Bande (750 bp) und der β-Aktin-Bande (500 bp) zeigt sich, dass die AAV-Rep-Bande nach Transduktion der 293-Zellen mit HSV/AAV nur diskret schwächer exprimiert wird als nach Transduktion mit HSV/AAV# (Abb. 19). Ob eine spezifische Integration mit HSV/AAV trotz dieser diskreten Verminderung der Rep-Expression möglich ist, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit geklärt werden.

4.6 Analyse einer Fremdgen-Integration in der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293

Im Hinblick auf spätere Untersuchungen zur Analyse einer Fremdgen-Integration in primäre hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen nach Transduktion mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wurde aufgrund der in Kapitel 4.4.2 gezeigten Ergebnisse zunächst die humane embryonale Nierenzelllinie 293 auf Einzelzellbasis untersucht.

4.6.1 Einzelzellklonierung von 293-Zellen

Vor der Einzelzellklonierung wurden die 293-Zellen mit 10 µl sowie mit 40 µl HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und mit einem den Vorversuchen entsprechenden Vielfachen an HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduziert. Zur weiteren Kontrolle wurde außerdem ein Ansatz gleichzeitig mit HSV (10 µl) und HSV/AAV (40 µl) transduziert.

Die Einzelzellklonierung (Kapitel 3.9) wurde 24 bis 48 h nach der Transduktion der Zielzellen durchgeführt. Die initiale Transduktionseffizienz lag zu diesem Zeitpunkt in allen Ansätzen bei etwa 60%. Insgesamt wurden zwei Transduktionen mit anschließender Einzelzellklonierung durchgeführt. Es wurden drei oder fünf Zellen in ein well einer 96-well-Platte pipettiert, was statistisch wie in Vorversuchen etabliert, zum Anwachsen eines Einzelzellklons pro well führen kann. Von jedem Ansatz wurden acht 96-well-Platten angelegt. Drei bis vier Wochen nach der Einzelzellklonierung (n.K.) wurden die Klonierungseffizienz (KE) (Anzahl der wells mit Einzelzellklonen/ Gesamtanzahl der wells) und die Transgenexpression (TE) (Anzahl der wells mit GFP+ Einzelzellklonen/ Gesamtanzahl der wells mit Einzelzellklonen) mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Die GFP+-293-Einzelzellklone sowie ein Einzelzellklon (HSV/AAV(GFP-Exp.neg.)), der zwar mit HSV/AAV transduziert wurde, aber zu keinem Zeitpunkt GFP+ war, wurden über die 3./4. Woche hinaus weiterkultiviert.

Ausgangszellzahl/ wells	Anzahl der Klonierungen	Vektor	Klonierungseffizienz (KE) Anzahl der wells mit Einzelzellklonen/ Gesamtanzahl der wells	KE in %	Transgenexpression (TE) Anzahl der wells mit GFP+ Einzelzellklonen/ Gesamtanzahl der wells mit Einzelzellklonen	TE in %
3	n=1	HSV	131 / 786	17	0 / 131	0
	n=1	HSV/AAV	106 / 786	14	6 / 106	6
	n=1	HSV/AAV+ HSV	48 / 786	6	0 / 48	0
5	n=2	HSV	571 / 1536	37	0 / 571	0
	n=2	HSV/AAV	229 / 1536	15	18 / 229	8
	n=1	HSV/AAV+ HSV	77 / 786	10	8 / 77	10

Tab. 4: Übersicht über die Klonierungseffizienz (KE) und Transgenexpression (TE) in den 293-Einzelzellklonen. Dargestellt sind die Ausgangszellzahl pro well, die Anzahl der durchgeführten Einzelzellklonierungen und der eingesetzte Vektor. Weiterhin sind die Klonierungseffizienz und die Transgenexpression in der 3./4. Woche nach der Einzelzellklonierung gezeigt.

Tab. 4 gibt eine Übersicht der Einzelzellklonierung. Es wird deutlich, dass bei einer Ausgangszellzahl von fünf Zellen pro well gegenüber einer Ausgangszellzahl von drei Zellen pro well die höheren Klonierungseffizienzen erreicht werden. Die niedrigste Klonierungseffizienz zeigt sich nach Transduktion der 293-Zellen mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV zusammen mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV, da die Doppelinfektion der Zellen gleichzeitig zu einer Verstärkung der zellulären Toxizität führt.

In Bezug auf die Transgenexpression wird deutlich, dass unabhängig von der Ausgangszellzahl sowohl die mit HSV/AAV transduzierten Zellen als auch die mit HSV/AAV+ HSV infizierten Zellen drei bis vier Wochen nach der Einzelzellklonierung eine Transgenexpression zeigen. Trotz einer höheren Toxizität und einer schlechten Klonierungseffizienz haben somit auch die mit HSV/AAV+ HSV infizierten Zellen eine hohe Persistenz der Transgenexpression. Die Transgenexpression der mit 10 µl oder 40 µl HSV-1-Standardamplikonvektor HSV transduzierten Zellen liegt in beiden Ansätzen nach drei bis vier Wochen bei 0%. Man kann daher davon ausgehen, dass die

Transgenexpression bei den doppeltinfizierten Zellen ausschließlich durch die Infektion mit HSV/AAV hervorgerufen wurde.

4.6.2 Nachweis einer stabilen GFP-Expression in den 293-Einzelzellklonen

Zum Nachweis einer stabilen GFP-Expression durch den HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wurde vor jeder Passagierung und bei der anschließenden Kultivierung der 293-Einzelzellklone die Transgenexpression der GFP+-Klone bis zur 15./17. Woche nach der Einzelzellklonierung mittels Durchflusszytometrie ermittelt. In Tab. 5 sind alle aus

Tab. 4 weiterkultivierten 293-Einzelzellklone mit der ermittelten GFP-Expression in der 4./6. und in der 15./17. Woche aufgeführt.

Vergleicht man zunächst die Anzahl der GFP+-Einzelzellklone aus Tab. 4 mit denen aus Tab. 5, so zeigt sich, dass zwischen der 3./4. Woche n.K. und der 4./6. Woche n.K. ein Verlust an GFP+-Einzelzellklonen stattgefunden hat. Dieser Verlust wird besonders bei den doppeltransduzierten Klonen deutlich, bei denen zum einen aufgrund der erhöhten vektorbedingten Zytotoxizität und zum anderen aufgrund der transienten GFP-Expression des Standardamplikonvektors HSV mehr als 50% der Klone verloren gingen.

KLON	Vektor	% GFP-Expression	% GFP-Expression
		4./6. Woche n.K.	15./17. Woche n.K.
293-Zellen	keine	0	0
HSV/AAV (GFP-Exp.neg.)	HSV/AAV	0	0
Klon 5	HSV/AAV	14	0
Klon 19	HSV/AAV	13	> 15
Klon 20	HSV/AAV	51	< 15
Klon 24	HSV/AAV	21	< 10
Klon 34	HSV/AAV	90	> 90
Klon 41	HSV/AAV	87	> 5
Klon 55	HSV/AAV	1	0
Klon 56	HSV/AAV	15	0
Klon 57	HSV/AAV	92	> 70
Klon 64	HSV/AAV	56	> 10
Klon 66	HSV/AAV	87	> 70
Klon 68	HSV/AAV	92	> 80
Klon 69	HSV/AAV	38	> 15
Klon 2'	HSV/AAV+ HSV	47	> 40
Klon 6'	HSV/AAV+ HSV	17	> 10
Klon 7'	HSV/AAV+ HSV	92	> 70
Klon 13'	HSV/AAV+ HSV	76	> 70

Tab. 5: Übersicht über alle weiterkultivierten 293-Einzelzellklone von der 4./6. Woche bis zur 15./17. Woche nach der Einzelzellklonierung. Für jeden Einzelzellklon sind der bei der Transduktion verwendete Vektor und die GFP-Expression in der Durchflusszytometrie in der 4./6. Woche und der 15./17. Woche nach der Einzelzellklonierung dargestellt. Als Negativ-Kontrolle wurde der Einzelzellklon HSV/AAV(GFP-Exp.neg.) eingesetzt, der nach Transduktion mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV zu keinem Zeitpunkt eine Transgenexpression zeigte (Klon' = Doppeltransduktion mit HSV/AAV und HSV).

Die Transgenexpression der verschiedenen GFP+-Einzelzellklone verhält sich unabhängig vom verwendeten Vektor sehr variabel (Tab. 5). Allgemein lässt sich zwischen 293-Einzelzellklonen mit hohen, mittleren und niedrigen Transgenexpressionen unterscheiden. Hohe Transgenexpressionen finden sich bei den in Tab. 5 grau hinterlegten 293-

Einzelzellklonen, bei denen die Transgenexpression zu beiden Messzeitpunkten bei über 70% liegt, und die in einem weiteren Versuch zum Nachweis einer spezifischen Integration in das humane Chromosom 19 im Southern Blot eingesetzt wurden (Kapitel 4.6.5). Diese GFP-Expressionen konnten auch bei den zwischen diesen Messzeitpunkten durchgeführten Bestimmungen der Transgenexpression nachgewiesen werden (Abb. 20). Bei Klon 19, Klon 20, Klon 64, Klon 69, Klon 2' und Klon 6' liegt die Transgenexpression zum ersten Messzeitpunkt bei nur 20 bis 60% und bleibt bis zum zweiten Messzeitpunkt annähernd konstant. Die Klone mit einer niedrigen Transgenexpression von etwa 10 bis 20% (Klon 5, Klon 24 und Klon 56) zeigen dagegen einen vollständigen Verlust der GFP-Expression bis zur 15./17. Woche nach der Klonierung. Auffallend ist der 293 Klon 41, bei dem die Transgenexpression in der 4./6. Woche n.K. bei 87% liegt, in der 15./17. Woche n.K. aber nur noch bei < 10%. Wie Abb. 20 zeigt, ist die GFP-Expression dieses Klon von der 1. bis zur 9. Woche n.K. konstant, fällt daraufhin auf 30% ab und liegt nach der 15. Woche n.K. bei < 10%.

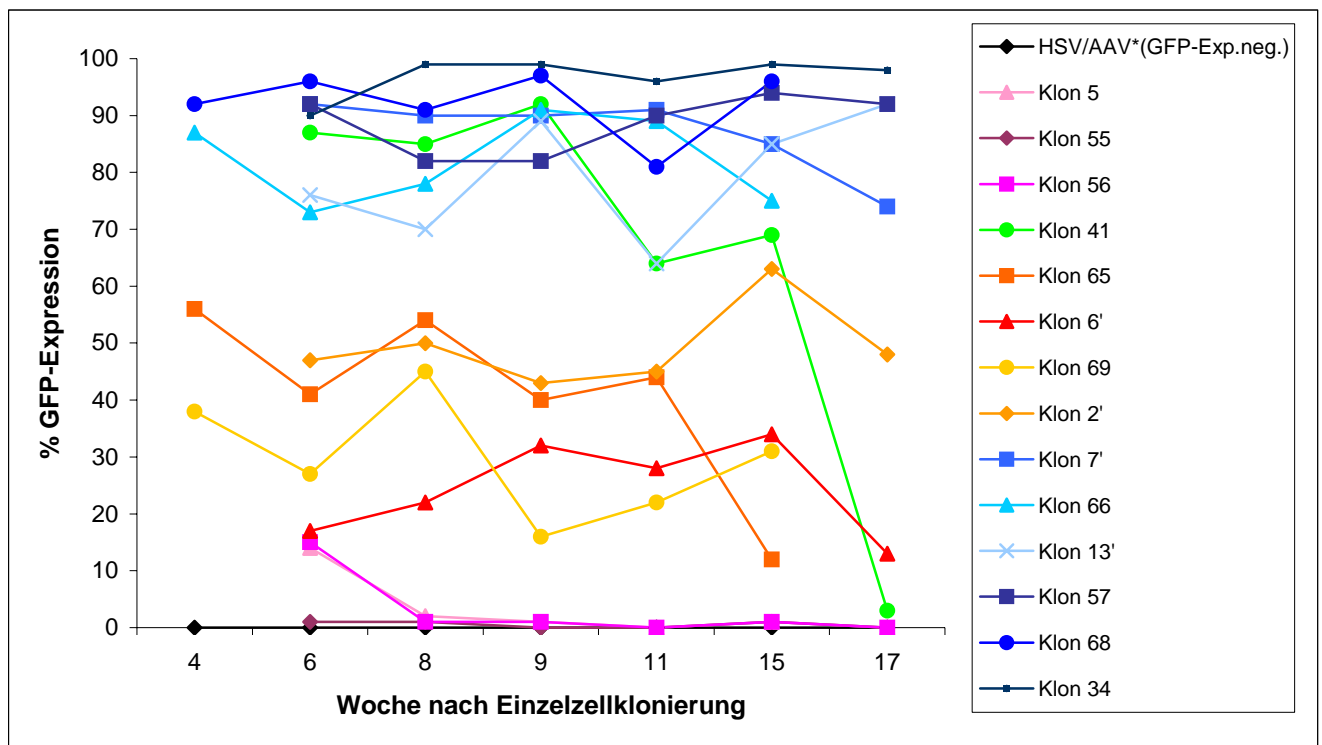


Abb. 20: Verlauf der GFP-Expression der ausgewählten 293-Einzelzellklone. Die GFP-Expression wurde von der 4. bis zur 17. Woche nach der Einzelzellklonierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

4.6.3 Bestimmung des Verlaufs der GFP-Expression von zwei stabilen 293-Einzelzellklonen über einen Zeitraum von bis zu 43 Wochen nach Klonierung

Um eine Langzeit-Transgenexpression auch über die 17. Woche hinaus nachweisen zu können, wurden zwei 293-Einzelzellklone, Klon 34 und Klon 7', über 43 Wochen n.K. weiterkultiviert und die GFP-Expression in regelmäßigen Abständen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Der stabile 293-Einzelzellklon 7' wurde nach der 19. Woche zwischenzeitlich für ca. 14 Wochen (102 Tage) cryokonserviert und anschließend die Messungen der GFP-Expression wieder aufgenommen.

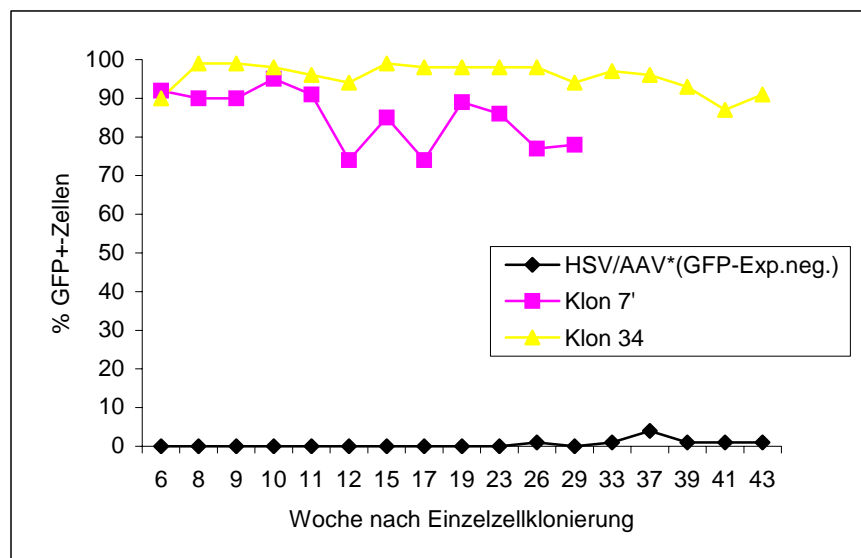


Abb. 21: Verlauf der GFP-Expression von Klon 7' und Klon 34. Die GFP-Expression wurde von der 6. bis zur 29. (Klon 7') und 43. (Klon 34) Woche nach der Einzelzellklonierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Der 293-Einzelzellklon HSV/AAV(GFP-Exp.neg.), der zu keinem Zeitpunkt eine GFP- Expression zeigte, wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Abb. 21 zeigt, dass die GFP-Expression von über 70% bei beiden Klonen bis zur 29. bzw. 43. Woche nach der Einzelzellklonierung stabil gehalten werden konnte. Es kann außerdem gezeigt werden, dass eine zwischenzeitliche Cryokonservierung keinen negativen Einfluß auf die Stabilität der GFP-Expression hat, da der Verlauf der GFP-Expression bei dem 293-Klon 7' auch nach der Cryokonservierung bei über 70% bleibt.

Zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Ergebnissen sind in Abb. 22 eine fluoreszenz- und eine lichtmikroskopische Aufnahme des 293 Klons 7' ca. 37 Wochen nach der Einzelzellklonierung dargestellt.

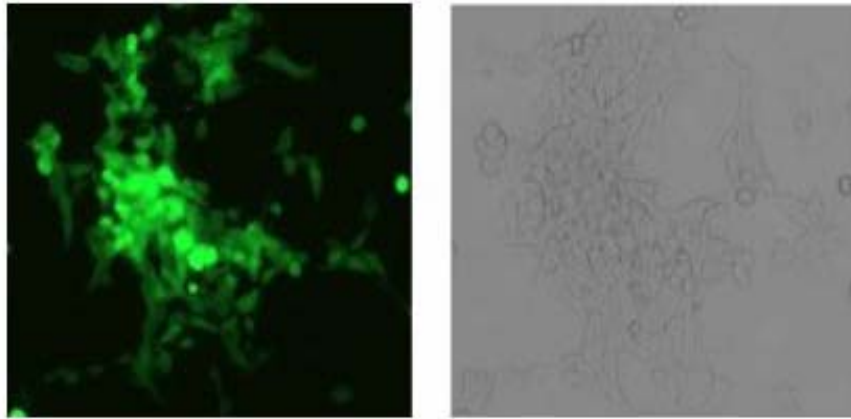
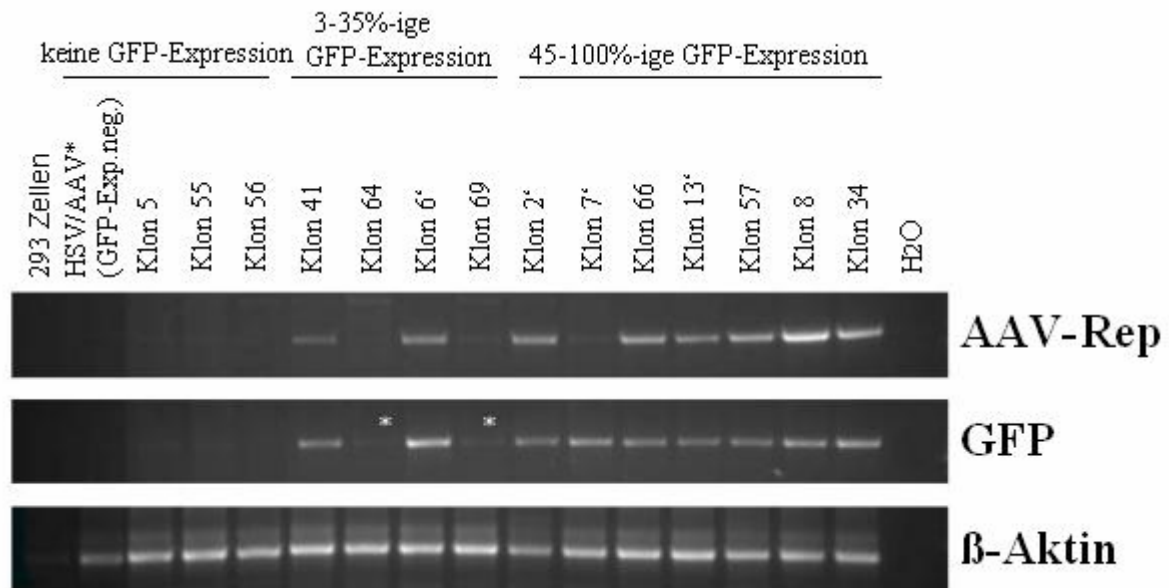


Abb. 22: Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahme des 293-Klons 7'. Links: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des stabilen 293-Einzelzellklons 7', rechts: lichtmikroskopische Aufnahme des gleichen Bildausschnittes des stabilen 293-Einzelzellklons 7'.

4.6.4 Nachweis des Transgens GFP in den 293-Einzelzellklonen durch PCR

Die DNA von nicht transduzierten 293-Zellen und 17 ausgewählten 293-Einzelzellklonen einschließlich der Negativ-Kontrolle HSV/AAV(GFP-Exp.neg.) wurde in der 15./17. Woche n.K. isoliert (Kapitel 3.2.2.3) und anschließend eine PCR durchgeführt (3.2.3). Es wurden drei unterschiedliche PCR-Ansätze verwendet: für den Nachweis des Transgens GFP, den Nachweis von AAV-Rep, als Anzeichen für eine unspezifische Integration ins Genom der Zielzelle oder ein episomales Vorliegen des Plasmids, und den Nachweis des Haushaltsgens β -Aktin, welches in jeder Zelle enthalten ist und somit als Positivkontrolle für die PCR diente. Neben den nicht transduzierten 293-Zellen wurde als weitere Negativkontrolle ein Ansatz mit H₂O verwendet.



* schwache Bande vorhanden

Abb. 23: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte zum Nachweis des Transgens GFP und des AAV-Rep-Gens in der DNA der 293-Einzelzellklone. Die DNA Extraktion erfolgte in der 15./17. Woche nach der Einzelzellklonierung. Es wurden 293-Einzelzellklone ohne GFP-Expression, mit einer GFP-Expression von 3 bis 35% und mit einer GFP-Expression von 40 bis 100% zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion ausgewählt. Die linke Bahn enthält als Kontrolle nicht transduzierte 293-Zellen. Die rechte Bahn enthält als zweite Kontrolle einen Ansatz mit H₂O. Als Verlaufskontrolle wurde ein Nachweis von β -Aktin in der DNA der Zielzellen durchgeführt.

Abb. 23 zeigt, dass in allen 17 Einzelzellklonen und den 293-Zellen eine β -Aktin-Bande von rund 500 bp vorhanden ist. Bei allen 293-Einzelzellklonen, die zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion eine GFP-Expression zeigten, kann eine GFP-Bande von rund 750 bp dargestellt werden. Eine AAV-Rep-Bande von rund 750 bp lässt sich bei den Klonen Klon 41 und Klon 6' mit einer GFP-Expression von 3 bis 35% und bei Klon 2', Klon 66, Klon 13', Klon 57, Klon 68 und Klon 34 mit einer GFP-Expression von 45 bis 100% darstellen.

4.6.5 Nachweis einer spezifischen Integration in die AAVS1-site des humanen Chromosoms 19 durch eine Southern Blot-Analyse

Bei den 293-Einzelzellklonen mit der höchsten langanhaltenden GFP-Expression (Abb. 20) wurde eine mögliche spezifische Integration des Transgens in die AAVS1-site des humanen

Chromosoms 19 mittels Southern Blot-Hybridisierung untersucht. In Abb. 24 ist der Nachweis der erfolgreichen Sondenherstellung gezeigt. In den linken Spuren sind die Banden der entsprechenden Sonden (GFP-Sonde: 746 bp, AAV-Rep-Sonde: 757 bp, AAVS1-Sonde: 298 bp) zu sehen. Als Negativkontrollen wurden Ansätze mit H₂O und den entsprechenden Primerpaaren verwendet.

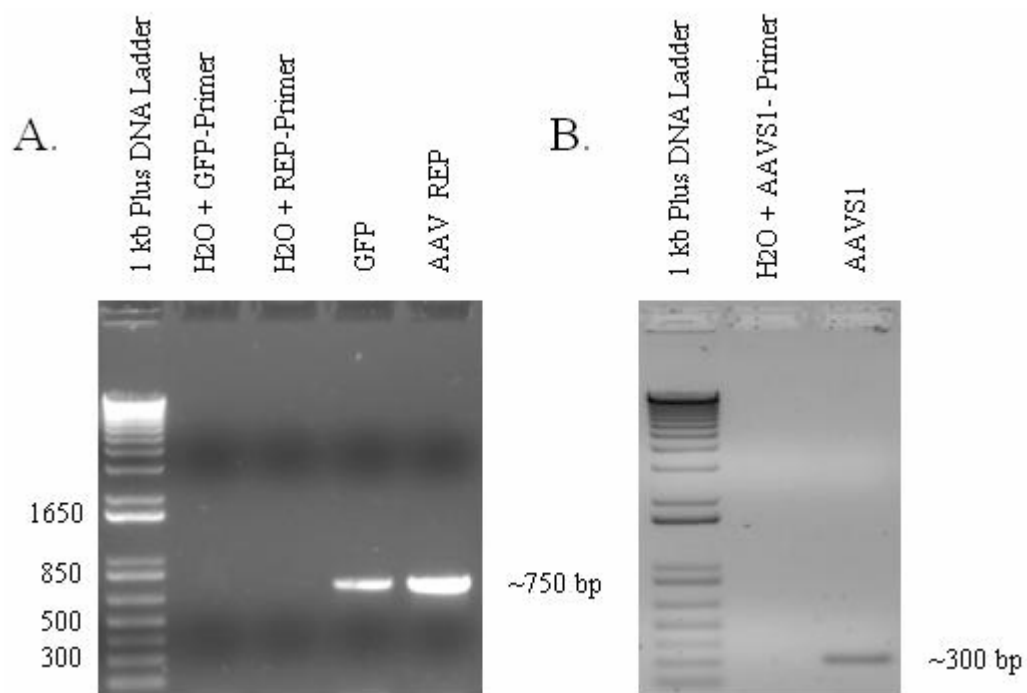


Abb. 24: Gelelektrophoretische Kontrolle der Sondenherstellung für die Southern Blot-Analyse.

A: Die beiden linken Spuren zeigen die Negativkontrollen. Die Banden (750 bp) in den beiden rechten Spuren entsprechen der GFP- bzw. AAV-Rep-Sonde. B: Die linke Spur zeigt die Negativkontrolle. Die Bande (300 bp) in der rechten Spur entspricht der AAVS1-Sonde.

Die Southern Blot-Analyse wurde mit Klon 34, Klon 68, Klon 7', Klon 66, Klon 13' und Klon 57 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden nicht transduzierte 293-Zellen verwendet. Der Blot wurde nacheinander mit den drei radioaktiv markierten Sonden für GFP, AAV-Rep und AAVS1 hybridisiert. Nach dem Auflegen eines Röntgenfilms auf den Blot und einer mehrstündigen Exposition konnte nach der Entwicklung des Films der Southern Blot ausgewertet werden.

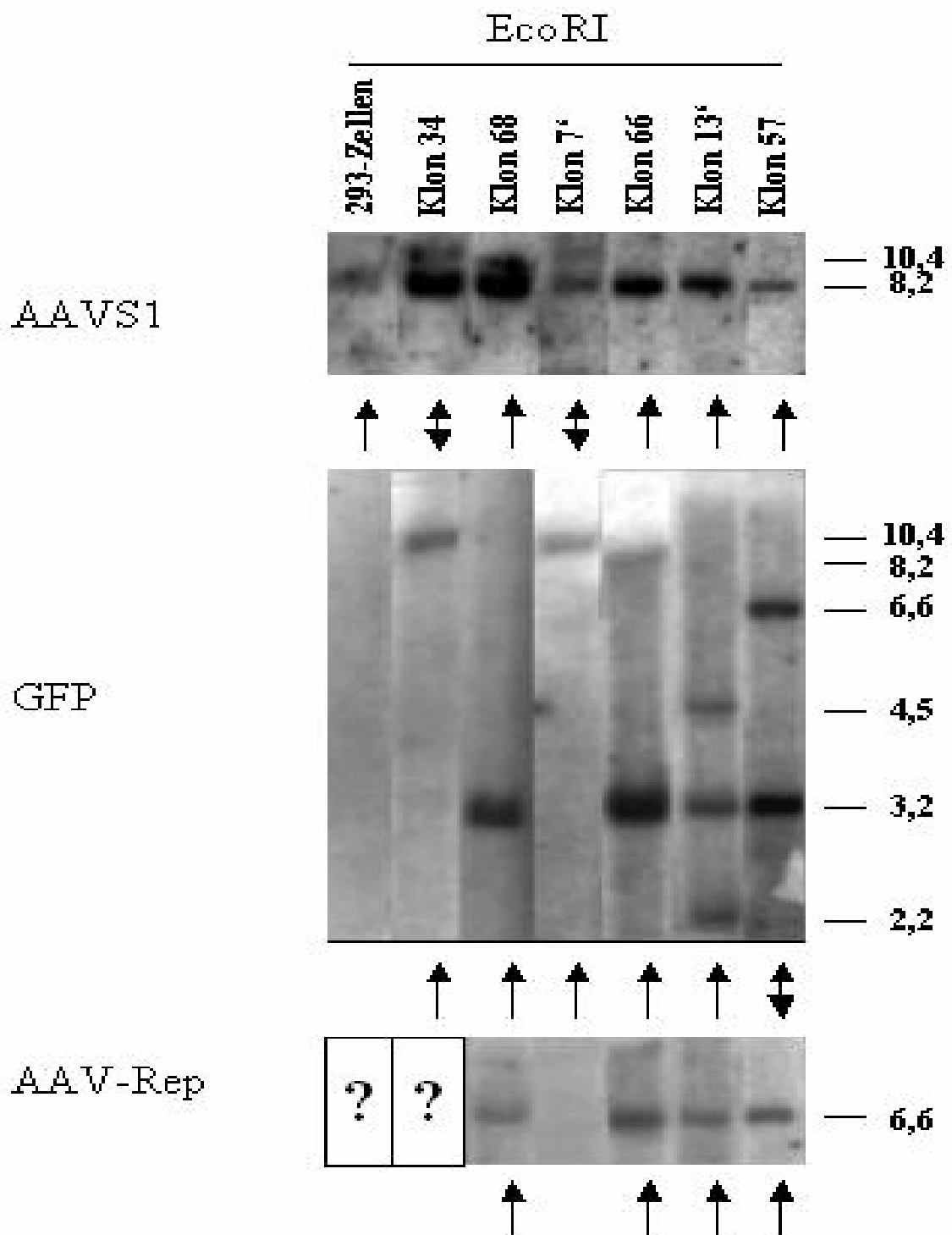


Abb. 25: Southern Blot-Analyse der DNA aus sechs verschiedenen 293-Einzelzellklonen zum Nachweis einer stabilen Integration des Transgens GFP bzw. von AAV-Rep in die AAVS1-site des humanen Chromosoms 19 nach Restriktionsverdau mit *EcoRI*. Alle 6 ausgewählten Klone zeigten zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion eine GFP-Expression von über 70%. Als Negativkontrolle wurden nicht transduzierte 293-Zellen eingesetzt. (Fragezeichen: Rep-Blot nicht auswertbar, Pfeil: Ko-Migration nur mit einer Sonde, Doppelpfeil: Ko-Migration mit beiden Sonden (identische Bandengröße)).

		AAVS1	GFP							AAV-Rep
293-Klone	% GFP-Expression	8,2 kb 10,4 kb	2,2 kb	3,2 kb	4,5 kb	6,9 kb	8,2 kb	10,4 kb	6,6 kb	
293-Zellen #	0	**								
Klon 34#	98	*** **	***							
Klon 68	96	***	***							**
Klon 7’	74	** *	***							
Klon 66	75	***	***							***
Klon 13’	92	***	***	***	***					***
Klon 57	92	**	***							***

#:Rep-Blot nicht auswertbar

Tab. 6: Auswertung der Southern Blot-Analyse zum Nachweis einer stabilen ortsspezifischen Integration des Transgens GFP in die AAVS1-site des humanen Chromosoms 19 nach Restriktionsverdau mit *EcoRI*. Dargestellt sind die GFP-Expression am Tag der DNA-Extraktion sowie die Größen der Banden von nicht transduzierten 293-Zellen (Negativkontrolle) und 6 ausgewählten 293-Einzelzellklonen nach Hybridisierung des Blots mit der AAVS1-, der GFP- und der AAV-Rep-Sonde (***: sehr deutliche Bande, **: deutliche Bande, *: schwächere Bande).

Aus Abb. 25 und Tab. 6 wird deutlich, dass sowohl bei allen sechs Klonen als auch bei den nicht transduzierten 293-Zellen nach Hybridisierung mit der AAVS1-Sonde eine Bande von ca. 8,2 kb detektiert werden kann. Bei Klon 34 und Klon 7' ist zusätzlich eine Bande von ca. 10,4 kb zu sehen.

Nach Hybridisierung mit der GFP-Sonde sind bei den nicht transduzierten 293-Zellen keine Banden sichtbar. Die vier Klone 68, 66, 13' und 57 weisen jeweils Banden von ca. 3,2 kb auf und keine 10,4 kb Banden, während es sich bei Klon 34 und Klon 7' genau anders herum verhält. Neben der Bande von 3,2 kb sind bei den 293-Einzelzellklonen 66, 13' und 57 einzelne Banden von 2,2 kb, 4,5 kb, 6,9 kb und 8 kb nach Hybridisierung mit der GFP-Sonde zu erkennen.

Nach Hybridisierung mit der AAV-Rep-Sonde sind wie auch schon nach der GFP-Hybridisierung bei den nicht transduzierten 293-Zellen keine Banden sichtbar. Bei den vier Klonen, welche nach der GFP-Hybridisierung eine Bande von 3,2 kb zeigten, ist nach der

AAV-Rep-Hybridisierung eine 6,6 kb Bande detektiert worden, während bei den anderen beiden Klonen keine Banden vorhanden sind. Dabei muss beachtet werden, dass sowohl von den nicht transduzierten 293-Zellen als auch von dem Klon 34 der Rep-Blot nicht eindeutig auszuwerten war.

Da die Auswertung der Southern Blot-Analyse aufgrund der verschiedenen Bandenmuster der Klone sehr komplex ist, soll an dieser Stelle bereits kurz auf die Ergebnisse eingegangen werden.

Ein spezifische Integration über die ITRs konnte, wie aus Abb. 25 und Tab. 6 ersichtlich ist, eindeutig für Klon 7' nachgewiesen werden. Nach Hybridisierung des Blots mit der AAVS1-Sonde konnte neben der 8,2 kb Bande, welche das *EcoRI*-Fragment der humanen DNA darstellt, auch eine 10,4 kb Bande detektiert werden. Wie bereits beschrieben, deutet die 10,4 kb Bande auf eine spezifische Integration des 2,2 kb großen „ITR GFP ITR“-Transgens innerhalb der AAVS1 spezifischen Region auf dem humanen Chromosom 19 hin (Abb. 26).

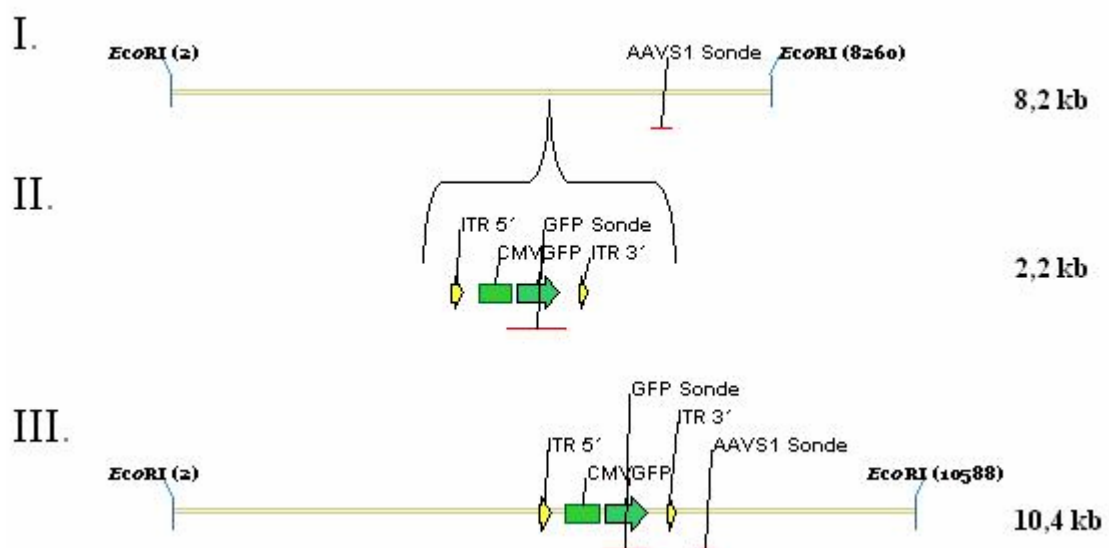


Abb. 26: Schematische Darstellung der ITR-vermittelten spezifischen Integration des Transgens in die AAVS1-site des humanen Chromosoms 19. I. Mit *EcoRI* geschnittenes AAVS1-Fragment des humanen Chromosoms 19. II. ITR-ITR-DNA Fragment. III. *EcoRI*-AAVS1-Fragment des humanen Chromosoms 19 nach ITR vermittelter Integration des Transgens GFP.

Bestätigen lässt sich diese Annahme dadurch, dass nach Hybridisierung mit der GFP-Sonde nur eine 10,4 kb Bande detektiert wurde. Das gleiche Bandenmuster trat auch bei Klon 34 in Erscheinung. Allerdings ist dabei zu beachten, dass der Southern Blot nach Hybridisierung mit der Rep-Sonde bei diesem Klon aufgrund einer zu starken Belichtung des Röntgenfilms nicht eindeutig ausgewertet werden konnte und in der PCR-Analyse eine Integration von Rep detektiert wurde.

Das Auftreten einer zusätzlichen 8,2 kb Bande lässt auf die Anwesenheit von Wildtyp-293-Zellen schließen, bei denen keine Integration stattgefunden hat.

Bei den verbleibenden Klonen 68, 66, 13' und 57 konnte mittels Southern Blot-Analyse keine AAV-spezifische Integration nachgewiesen werden, da neben der 8,2 kb Bande keine zusätzliche AAVS1-Bande auftrat.

Alle vier Klone zeigen folgendes einheitliches Bandenmuster: eine 3,2 kb Bande nach Hybridisierung mit der GFP-Sonde sowie eine 6,6 kb Bande nach Hybridisierung mit der Rep-Sonde. Dieses Bandenmuster ist durch eine Integration sogenannter „head to tail“ Konkatemere erklärbar, bei denen das gesamte Amplikon-Plasmid integriert. Durch die Konkatemerisierung bleibt die *EcoRI* Restriktionsschnittstelle stromabwärts der 3' ITR demnach Teil des potentiell integrierten Plasmids (Cheung et al., 1980; Laughlin et al., 1986; McLaughlin et al., 1988). Aus Gründen der Übersicht ist in der nachfolgenden Abb. 27 nur eine Dimerisierung zweier Plasmide über die 3' ITRs dargestellt. Das Bandenmuster ist hierbei unabhängig von der Anzahl der Konkatemere.

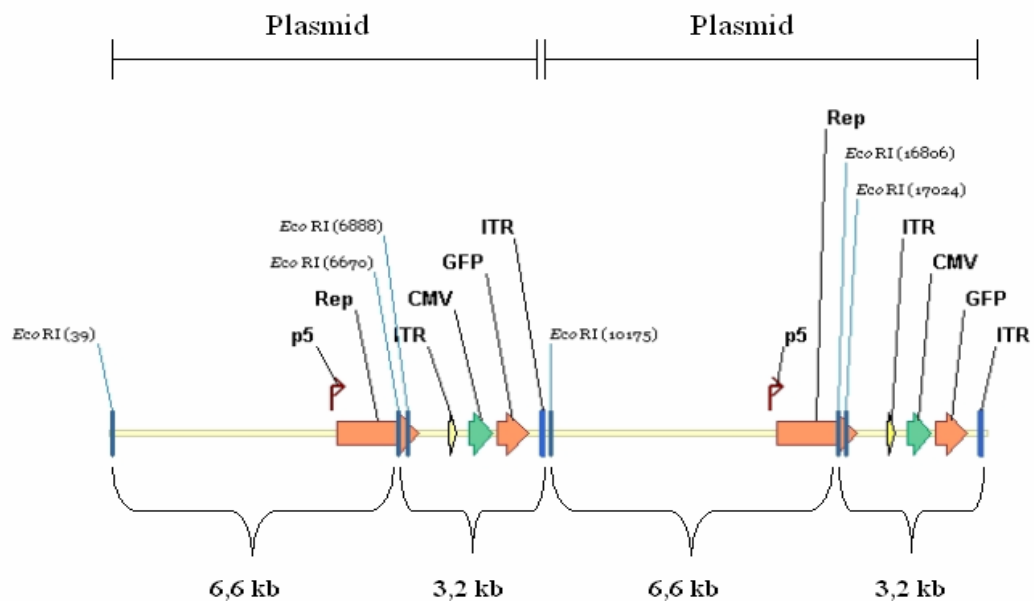


Abb. 27: Schematische Darstellung der ITR-vermittelten Integration des gesamten Amplikon-Plasmids über „head to tail“ Konkatemere. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Strukturen sind die *EcoRI*-Schnittstellen dargestellt, welche das Plasmid in drei *EcoRI*-Fragmente mit einer Größe von 6,6 kb, 3,2 kb und 0,2 kb (in der Abbildung nicht dargestellt) unterteilen.

Obwohl durch die Phenol-Chloroformextraktion vor allem hochmolekulare DNA isoliert wurde, lässt die Southern Blot Analyse letztlich keine eindeutige Unterscheidung zu, ob die in Abb. 27 dargestellten „head to tail“ Konkatemere integriert vorliegen oder ob die Amplikon-Plasmide episomal persistieren.

Die zusätzlichen Banden, die in den Klonen 13' und 57 nach der Hybridisierung mit der GFP-Sonde detektiert wurden, können wie folgt erklärt werden: Die 2,2 kb Bande kann durch eine „head to tail“-Konkatemerbildung nur des eigentlichen „ITR GFP ITR“-Abschnittes entstanden sein, bei der zwischen den einzelnen „ITR GFP ITR“-Abschnitten eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle liegt, die im Amplikon-Plasmid 47 bp stromabwärts der 3' ITR und ohne „head to tail“-Konkatemerisierung außerhalb der Integrationskassette liegen würde. In Abb. 28 ist diese mögliche Integration für die AAVS1-site im Chromosom 19 dargestellt.

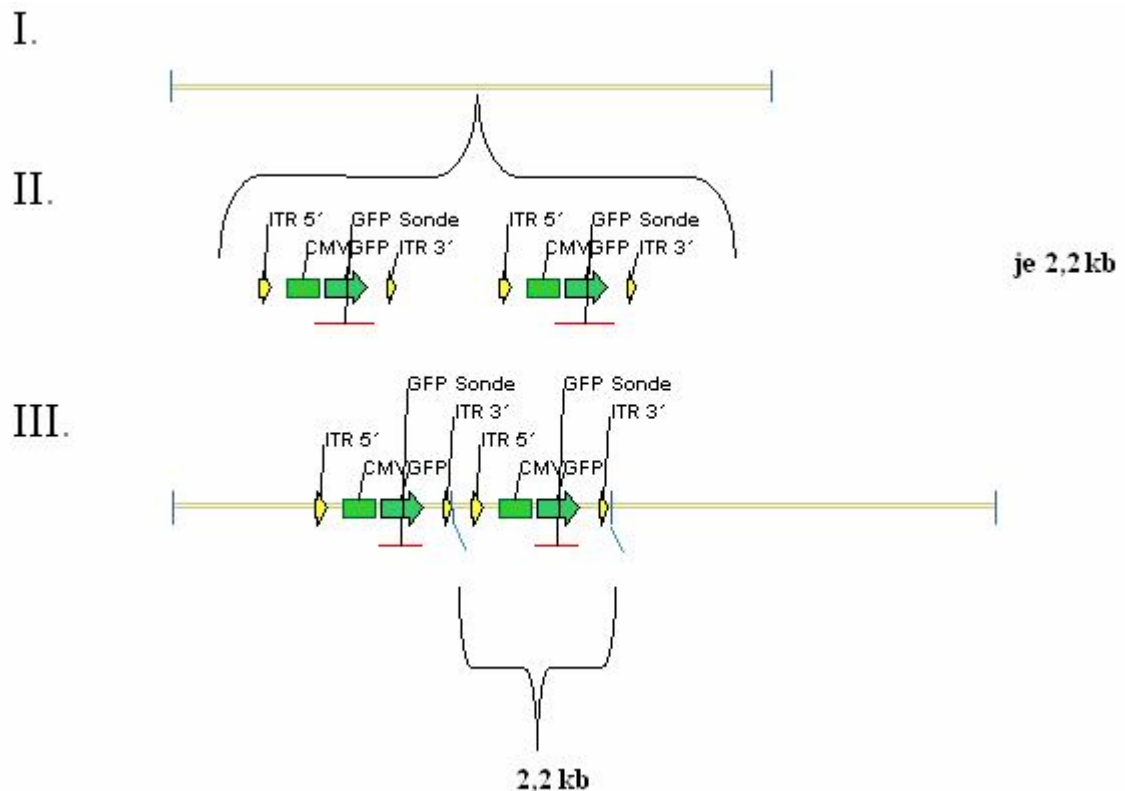


Abb. 28: Schematische Darstellung einer unspezifischen Integration des Transgens in das humane Genom. I. Genomische DNA II. ITR-ITR-DNA Fragmente, die als „head to tail“-Konkatermer integrieren III. Fragment genomischer DNA nach unspezifischer Integration des Transgens GFP. Es liegt eine Konkatermerisierung der ITR-ITR DNA-Abschnitte vor, aufgrund einer „head to tail“-Integration eines zweiten ITR-ITR DNA-Abschnittes im direkten Anschluß an das eigentliche Integrationsfragment.

Die 4,5 kb Bande bei Klon 13' sowie die 6,9 kb Bande bei Klon 57 nach Hybridisierung mit der GFP-Sonde können auf ähnliche Weise erklärt werden. Hier würde nach zwei „ITR GFP ITR“-Abschnitten (4,5 kb Bande) bzw. nach drei „ITR GFP ITR“-Abschnitten (6,9 kb Bande) die besagte *EcoRI* Restriktionsschnittstelle, die im Amplikon-Plasmid 47 bp stromabwärts der 3'ITR zu finden ist und die ohne Konkatermerisierung außerhalb der Integrationskassette liegen würde, erhalten bleiben. In diesem Fall könnte die Konkatermerisierung nicht nur „head to tail“ sondern oder auch „tail to tail“ stattgefunden haben. Auch in diesen beschriebenen Fällen lässt die Southern Blot Analyse keine Unterscheidung zu, ob die Konkatermere integriert vorliegen oder episomal persistieren.

4.6.6 Zusammenfassung der PCR- und Southern Blot-Ergebnisse

Um eine bessere Übersicht über die Ergebnisse der PCR- und der Southern Blot-Analyse zu erhalten, wurden diese zusammen mit der entsprechenden GFP-Expression in der 15. Woche n.K. in Tab. 7 zusammengestellt. Sowohl in der PCR-Analyse als auch im Southern Blot konnte bei allen 293-Einzelzellklonen, bei denen über diesen Zeitraum mindestens 70 % der Zellen eine GFP Expression aufwiesen, eine GFP Bande detektiert werden. Auch die Detektion der AAV-Rep-Banden stimmt in der PCR-Analyse und der Southern Blot-Analyse überein. Eine Ausnahme stellt der Klon 34 dar, da der Southern Blot nach Hybridisierung mit der AAV-Rep-Sonde bei diesem Klon nicht eindeutig auswertbar war.

293-Klon	% GFP-Expression 15. Woche n.K.	PCR			Southern Blot		
		AAV-Rep	GFP	β -Aktin	AAVS1	GFP	AAV-Rep
293-Zellen	0			+			
Klon 7'	74		+	+	+	+	
Klon 66	75	+	+	+		+	+
Klon 13'	92	+	+	+		+	+
Klon 57	92	+	+	+		+	+
Klon 68	96	+	+	+		+	+
Klon 34	98	+	+	+	+	+	(?)

Tab. 7: Übersicht der Ergebnisse der PCR- und Southern Blot-Analyse verschiedener 293-Einzelzellklone. Es wurden die GFP-Expression in der 15. Woche nach der Einzelzellklonierung und die Ergebnisse der PCR- und Southern Blot- Analyse auf einen Blick dargestellt (+: Bande(n) vorhanden).

4.7 Untersuchung einer stabilen Transgenexpression in humanen hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen

4.7.1 Transduktion humaner hämatopoetischer CD34+-Stammzellen

Humane hämatopoetische CD34+-Stammzellen bieten ein attraktives Ziel für die Gentherapie. Es wurden bereits diverse Vektorsysteme zur optimalen genetischen

Manipulation dieser Zellen erprobt (Halene et al., 2000). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, mit welcher Effizienz HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren humane CD34⁺-Stammzellen transduzieren, wie sich die Transgenexpression im Verlaufe der Zeit verhält und ob eine mögliche Fremdgen-Integration nachgewiesen werden kann.

4.7.1.1 Nachweis von Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren

Voraussetzung für eine Transduktion von humanen CD34⁺-Stammzellen mit HSV-Amplikonvektoren ist das Vorhandensein der sogenannten Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren auf der Zellmembran der Zellen, über welche die Wechselwirkungen zwischen Zelle und Virus bzw. Vektor vermittelt werden. Dabei wird zwischen den Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren A, B und C unterschieden.

Für den Nachweis der mRNAs der einzelnen Rezeptoren wurde eine RT-PCR durchgeführt (Kapitel 3.3.2.1). Den PCR-Ansätzen wurden die verschiedenen Hve-spezifischen Primerpaare (Kapitel 2.5.4.2) zugegeben und die Ansätze mit cDNA (+) und ohne cDNA (-) getestet. Als Positivkontrolle für die PCR wurde durch die Zugabe von β -Aktin-spezifischen Primern (Kapitel 2.5.4.1) das Haushaltsgen β -Aktin bestimmt, welches in allen Zellen enthalten ist. Weiterhin wurde ein Ansatz ohne die Zugabe eines Hve-spezifischen Primerpaares mitgeführt.

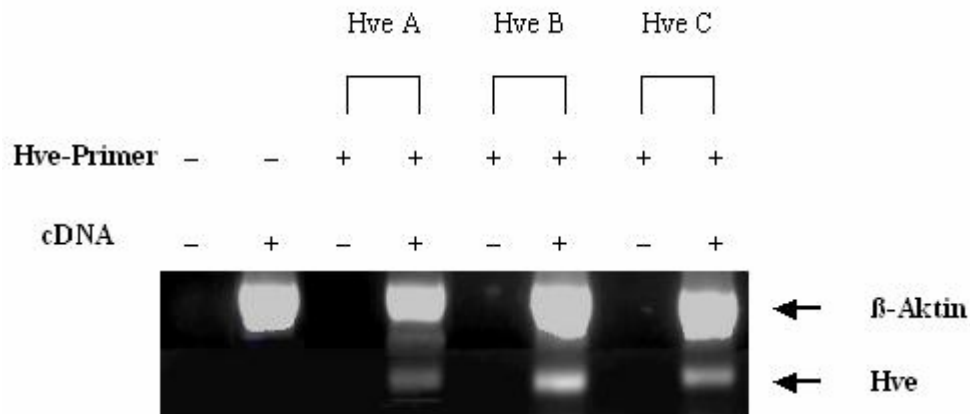


Abb. 29: Nachweis der Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren-mRNA A, B und C in humanen CD34⁺- Stammzellen. Zum Nachweis der Rezeptoren wurden den jeweiligen Ansätzen die entsprechenden Hve-spezifischen Primerpaare zugegeben und jeweils mit cDNA (+) und ohne cDNA (-) getestet. Ein Ansatz wurde ohne Zugabe eines Hve-spezifischen Primerpaares geprüft. Als Kontrolle wurde eine β-Aktin-Bestimmung durchgeführt.

In allen Ansätzen, bei denen cDNA zugegeben wurde, kann eine β-Aktin Bande detektiert werden. Wurde gleichzeitig mit der cDNA ein Hve-spezifisches Primerpaar verwendet, lässt sich neben der β-Aktin Bande auch die entsprechende Hve-Bande detektieren. In dem Ansatz mit cDNA, aber ohne ein Hve-spezifisches Primerpaar, kann nur die β-Aktin Bande detektiert werden (Abb. 29).

4.7.1.2 Bestimmung der Transduktionseffizienz 24 h nach der Transduktion

Eine Transduktion der CD34⁺-Stammzellen mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV konnte bereits nachgewiesen werden, was gleichzeitig auch ein Nachweis für das Vorhandensein der Hve-spezifischen Rezeptoren in diesen Zellen ist (Müller, 2004). Nun sollte untersucht werden, ob eine Transduktion dieser Zellen auch mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV möglich ist.

Vor jeder Transduktion der CD34⁺-Stammzellen wurde zunächst eine Vitalitätsbestimmung mittels einer Propidiumiodid-Färbung (Kapitel 3.7.2) mit anschließender Auswertung mittels einer Durchflusszytometrie durchgeführt. Bei einer vorliegenden Vitalität von über 90% wurden 2×10^5 CD34⁺-Stammzellen mit dem

HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduziert. Aufgrund der schweren Transduzierbarkeit dieser Zellen wurde zunächst ein Überschuss an Hybridamplikonvektor bei der Transduktion eingesetzt. 24 h nach der Transduktion wurde zum Nachweis von CD34 eine Färbung mit anti-humanen CD34-Antikörpern, wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

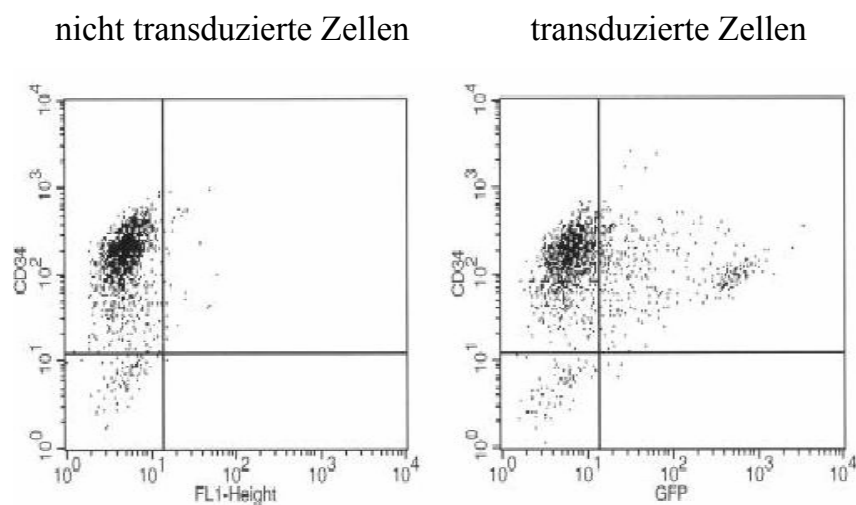


Abb. 30: FACS-Ergebnisse der Transduktionseffizienz in CD34+-Stammzellen 24h nach der Transduktion. Links: Nicht transduzierte CD34+-Zellen, rechts: Transduktionseffizienz in den CD34+-Zellen nach Zugabe von 200 μ l HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV.

Es zeigt sich, dass sich die humanen CD+-Stammzellen mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV (Abb. 30) transduzieren lassen. Die Transduktionseffizienz von ca. 21% nach Transduktion mit 200 μ l HSV/AAV ist mit der Transduktionseffizienz nach einer Transduktion der primären CD34+-Stammzellen mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV vergleichbar.

4.7.1.3 Vergleich der Transgenexpression und der Toxizität im Zeitverlauf

Nachdem eine erfolgreiche Transduktion gezeigt werden konnte, sollten nun die Transgenexpression und die Toxizität über einen längeren Zeitraum nach der Transduktion

beobachtet werden. Die Transduktion der CD34⁺-Stammzellen (Kapitel 3.6.3) wurde aufgrund der Transduktionsversuche mit lymphohämatopoetischen Zelllinien und der schweren Transduzierbarkeit dieser Zellen mit 140 µl HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV durchgeführt. Um einen besseren Vergleich der Toxizität zu erhalten, wurde zunächst die äquivalente Vektormenge an HSV-1-Standardamplikonvektor HSV bei der Transduktion eingesetzt. Die Transgenexpression wurde über einen Zeitraum von 12 Tagen nach der Transduktion betrachtet.

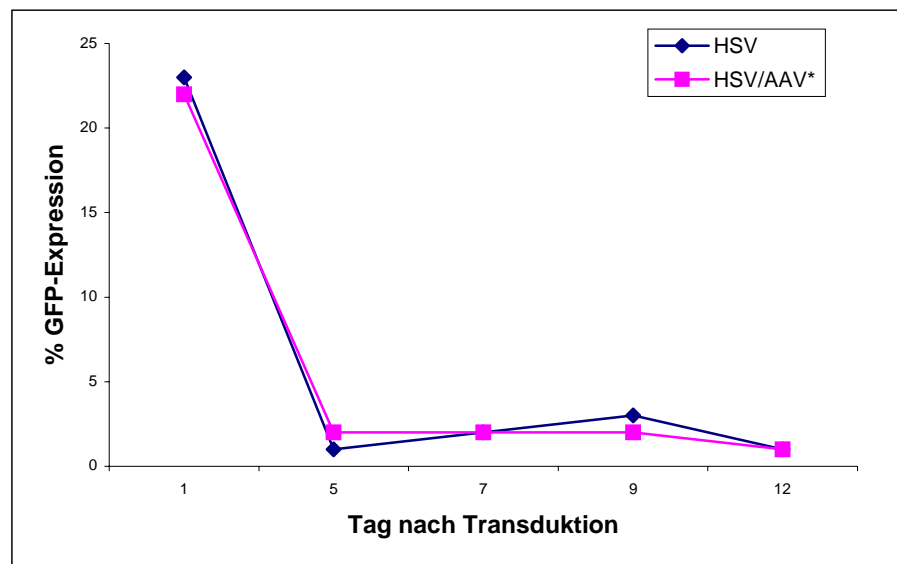


Abb. 31: Vergleich der GFP-Expression in humanen CD34⁺-Stammzellen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV. Die CD34⁺-Stammzellen wurden mit jeweils 140 µl Vektor transduziert und die Transgenexpression an Tag 1, Tag 5, Tag 7, Tag 9 und Tag 12 nach der Transduktion mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

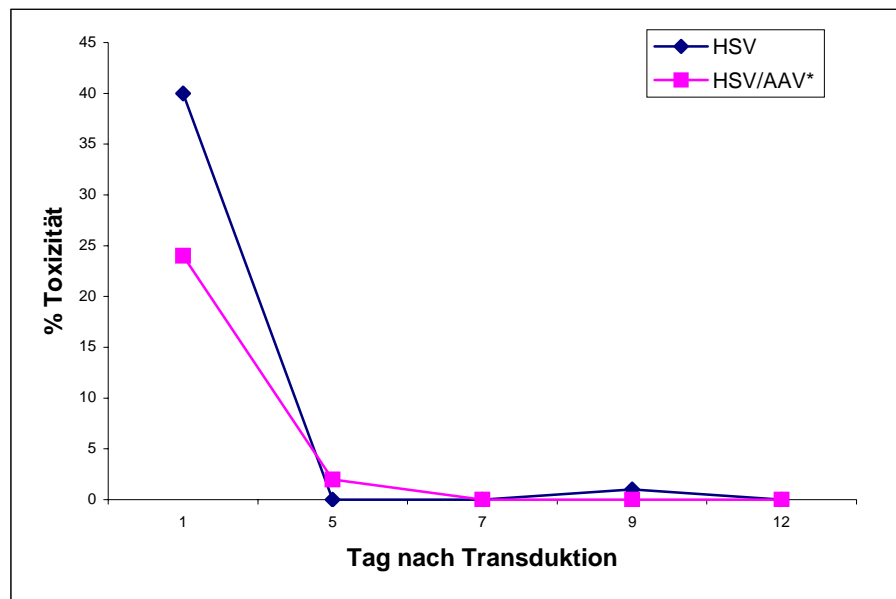


Abb. 32: Vergleich der prozentualen Toxizität in humanen CD34+-Stammzellen über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV. Die CD34+-Stammzellen wurden mit jeweils 140 µl Vektor transduziert und die prozentuale Toxizität an Tag 1, Tag 5, Tag 7, Tag 9 und Tag 12 nach der Transduktion mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Nach Transduktion der CD34+-Stammzellen mit HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wird eine annähernd gleiche initiale Transduktionseffizienz von ca. 21% erreicht (Abb. 31). Der Verlust der Transgenexpression auf 1 bis 2% findet in beiden Transduktionsansätzen bis zum 5. Tag nach der Transduktion statt. Die Transgenexpression von 1 bis 2% bleibt dann bis zum 12. Tag nach der Transduktion erhalten. Wird die Vektormenge auf 340 µl erhöht, kann eine höhere initiale Transduktionseffizienz (ca. 30 bis 40%) erreicht werden, ein Abfall der Transgenexpression auf 1 bis 2% am 5. Tag nach der Transduktion lässt sich aber nicht verhindern (nicht dargestellt). Die prozentuale Toxizität ist am 1. Tag nach der Transduktion mit HSV annähernd doppelt so hoch wie nach Transduktion der Zellen mit HSV/AAV. Entsprechend der Transgenexpression fällt die Toxizität in beiden Transduktionsansätzen am 5. Tag nach der Transduktion auf 0 bis 2% ab (Abb. 32).

Um den prozentualen Anteil an GFP+-Zellen besser beurteilen zu können, wurde in einem analogen Versuch anhand der mittels Durchflusszytometrie gemessenen

Transgenexpression und Toxizität die absolute Anzahl an vitalen GFP+-Zellen über einen Zeitraum vom 1. bis

8. Tag nach Transduktion der primären CD34+-Stammzellen ermittelt und der entsprechende Faktor der Zunahme an lebenden GFP+-Zellen berechnet (Abb.33).

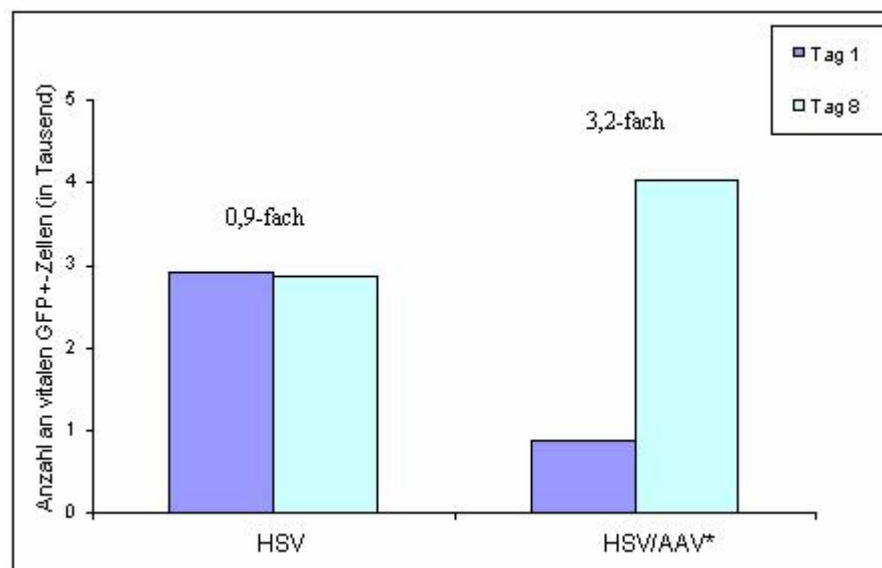


Abb. 33: Darstellung der absoluten Zellzahl an vitalen GFP+-Zellen am 1. und 8. Tag nach der Transduktion. CD34+-Stammzellen wurden mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduziert. Die Zahlen oberhalb der Säulen geben die Zunahme an absoluten vitalen GFP+-Zellen vom 1. bis zum 8. Tag nach der Transduktion an.

Nach Transduktion der Zellen mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV bleibt die Anzahl an vitalen GFP+-Zellen vom 1. bis zum 8. Tag annähernd konstant. Bei den mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduzierten Zellen kann eine höhere Anzahl an vitalen GFP+-Zellen festgestellt werden. Die Zunahme der Anzahl an lebenden GFP+-Zellen nach Transduktion mit HSV/AAV liegt bei einem Faktor von 3,2.

4.7.2 Transduktion humaner mesenchymaler Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (MSZ) bieten wie hämatopoetische Stammzellen ein attraktives Ziel für die Gentherapie (Kapitel 1.5.2). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, mit welcher Effizienz HSV-1-Standardamplikonvektoren und HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren humane mesenchymale Stammzellen transduzieren, wie sich die Transgenexpression im Verlauf der Zeit verhält und ob eine mögliche Fremdgen-Integration nachgewiesen werden kann.

4.7.2.1 Bestimmung der Transduktionseffizienz und der Toxizität 24 h nach der Transduktion

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Transduktion von MSZ mit HSV-Vektoren möglich ist. Die Transduktion der MSZ wurde, wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden mit 40 μ l HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und 140 μ l HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde 24 h später mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb34).

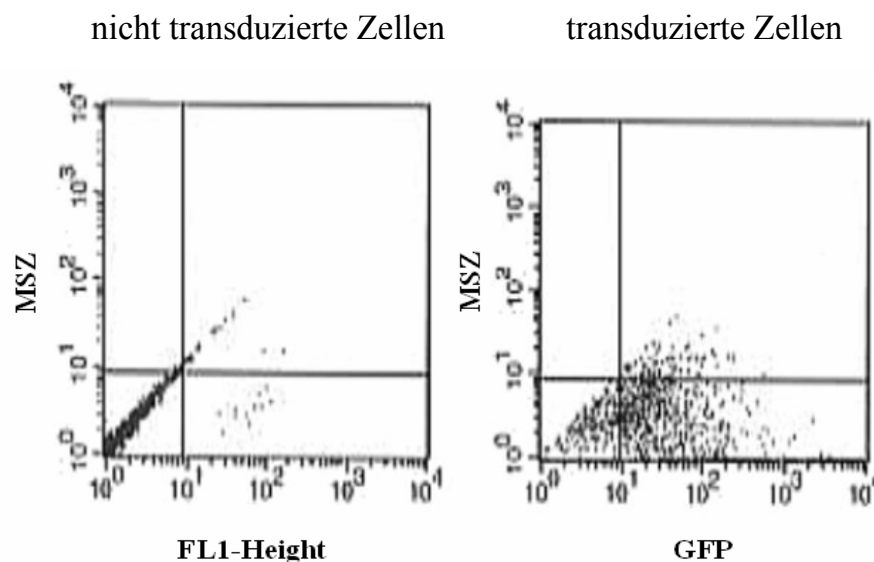


Abb. 34: FACS-Ergebnisse der Transduktionseffizienz in humanen mesenchymalen Stammzellen 24 h nach der Transduktion. Links: Transduktionseffizienz ohne Vektorzugabe, rechts: Transduktionseffizienz nach Zugabe des HSV-1-Standardamplikonvektors HSV.

Wie aus Abb. 35 ersichtlich, lassen sich MSZ sowohl mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV als auch mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduzieren. Während die Transduktionseffizienz von ca. 90% bei beiden Vektoren vergleichbar ist, liegt bezüglich der Toxizität ein signifikanter Unterschied vor. Die Toxizität hat sich nach Transduktion mit HSV/AAV im Vergleich zur Toxizität nach Transduktion mit HSV (Abb. 35) verdreifacht.

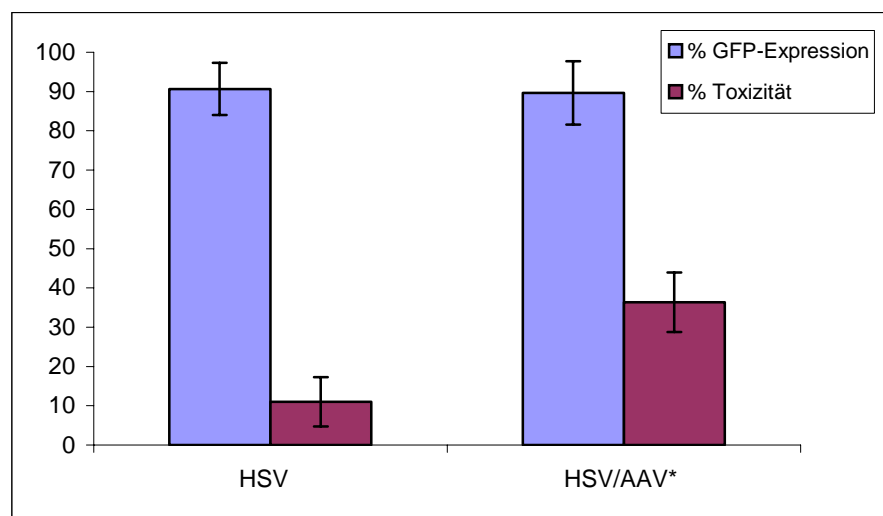


Abb. 35: Vergleich der GFP-Expression und prozentualen Toxizität 24 h nach der Transduktion von humanen mesenchymalen Stammzellen. Die Zellen wurden mit 40 μ l HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und 140 μ l HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduziert und die Transduktionseffizienz sowie die Toxizität mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Mittelwert und SD sind dargestellt (n = 3).

4.7.2.2 Vergleich der Transgenexpression und der Toxizität im Zeitverlauf

Nachdem dargestellt werden konnte, dass eine Transduktion der MSZ mit HSV-Vektoren möglich ist, sollten die Transgenexpression und Toxizität über einen längeren Zeitraum nach der Transduktion betrachtet werden. Die Transduktion der MSZ wurde wiederum mit 40 μ l HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und 140 μ l HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV durchgeführt und die Transgenexpression über einen Zeitraum von 33 Tagen nach der Transduktion beobachtet.

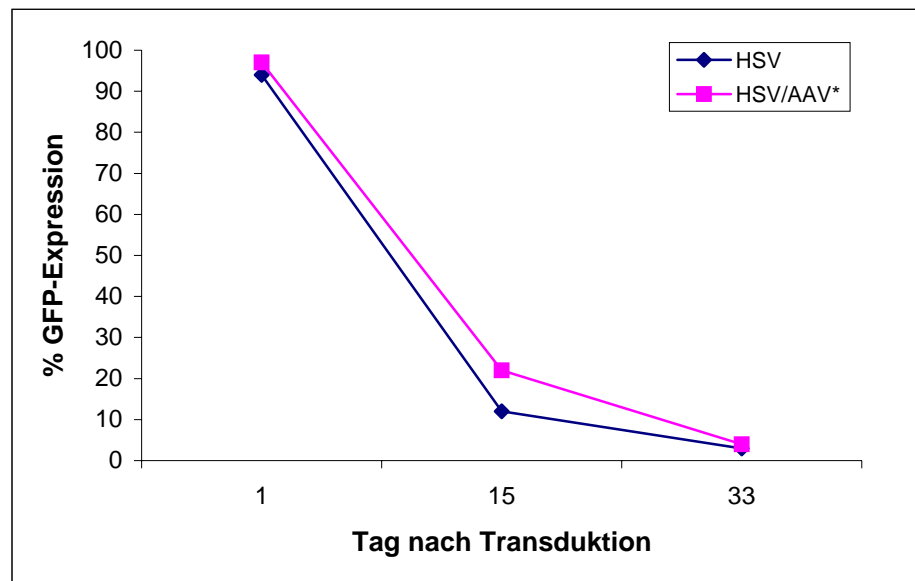


Abb. 36: Vergleich der GFP-Expression in humanen mesenchymalen Stammzellen über einen Zeitraum von 33 Tagen nach Transduktion. Die Zellen wurden mit 40 μ l HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und 140 μ l HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV transduziert und die Transduktionseffizienz am 1., 15. und 33. Tag nach der Transduktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Wie in Abb. 36 dargestellt, wird nach Transduktion mit HSV und HSV/AAV eine annähernd gleiche initiale Transduktionseffizienz von ca. 95% erreicht, was die Ergebnisse aus Kapitel 4.7.2.1 bestätigt. Im weiteren Verlauf fällt die Transgenexpression nach Transduktion mit HSV bis zum 15. Tag auf 12% ab, während sie nach Transduktion mit HSV/AAV noch einen Wert von 22% erreicht. 33 Tage nach der Transduktion ist die Transgenexpression in beiden Ansätzen auf 3 bis 4% abgefallen.

5 DISKUSSION

Obwohl seit den Anfängen der Gentherapie 1989 bereits Erfolge in klinischen Versuchen zum Beispiel bei der Behandlung von SCID (severe combined immune deficiency, schwere kombinierte Immunschwäche)-Kindern erzielt werden konnten (Anderson et al., 1990; Blaese et al., 1995), wurde bisher noch kein ideales Vektorsystem gefunden, das in hohen Konzentrationen leicht und reproduzierbar herzustellen ist, einen gerichteten Transfer in spezifische Zielzellen ermöglicht und eine Integration in charakteristische chromosomale Orte, die eine stabile Expression erlauben, gewährleistet. Die drei Hauptgruppen der bislang verwendeten viralen Vektoren werden nach der unspezifischen genomischen Integration in das Wirtschromosom (Retroviren), der Persistenz im Nukleus als extrachromosomales Episom (Adenoviren, Herpes simplex Viren) oder in die Kombination von Viren, die sogenannten „Hybridvektoren“ (Herpes simplex Viren und adeno-assoziierte Viren (HSV/AAV)) eingeteilt (Thomas et al., 2003). Das Hauptproblem der viralen Vektoren liegt in der zufälligen Integration des therapeutischen Gens (Transgen) in das Genom der Patienten (Hacein-Bey-Abina et al., 2003), wodurch die Gefahr einer Insertionsmutagenese erhöht wird. Der Wildtyp der AAV ist das einzige eukaryontische Virus, das eine stabile Integration des Transgens in das humane Genom an einer definierten Stelle des Chromosoms ermöglicht (Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1998), wodurch die Gefahr einer Insertionsmutagenese minimiert wird. Ein Nachteil der AAV-Vektoren ist die limitierende Größe des AAV-Genoms von 4,7 kb und die dadurch bedingte geringe Transgenkapazität.

Mit dem Ziel, die Transgenkapazität zu erhöhen, wurden in der ersten Generation der AAV-Vektoren die von den ITRs flankierten Sequenzen für die viralen Rep- und Cap-Gene entfernt. Die Deletion der Rep-Sequenzen führte zu einem Verlust der ortsspezifischen Integration (Ponnazhagan et al., 1997). Um den Verlust der Rep-Expression zu kompensieren, wurden Hybridvektoren entwickelt, welche die Rep-Gene in *trans* bereitstellen (Zweiplasmidsystem). Da mit diesen Hybridvektoren jedoch nur eine niedrige Rate an gezielten Integrationen in das humane Chromosom 19 erreicht werden konnte,

wurden HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren entwickelt. Diese sollten das Einbringen der für die ortsspezifische Integration essentiellen AAV-Elemente (p5-Promotor (p5IEE), Rep und die das Transgen flankierenden ITRs) in *cis* auf einem Vektor ermöglichen und somit die große Verpackungskapazität von HSV-1 mit dem Potential einer ortsspezifischen Integration und Langzeit-Genexpression von AAV in einem Vektor kombinieren.

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren basieren auf helfervirusfreien HSV- und HSV/AAV-Amplikons (Johnston et al., 1997). Für deren Herstellung wird eine Produktions-Zelllinie mit einem bakteriellen artifiziellen Chromosom (BAC) (Suter et al., 1999), dem das Transgen tragenden Plasmid und dem Plasmid pEBH ICP27, welches das im BAC-Plasmid deletierte essentielle Gen IE 2 (immediate early protein 2) liefert, kointransfiziert (Saeki et al., 1998). Das BAC stellt die erforderlichen herpesviralen Helferfunktionen in *trans* bereit und übernimmt somit die Funktion der Helferviren. Dadurch können die durch die Helferviren bedingte Zielzelltoxizität und Vektorimmunogenität, die bei korrektiven gentherapeutischen Ansätzen von Nachteil wären, so niedrig wie möglich gehalten werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass rekombinante, auf HSV-2 basierende Vektoren maligne und nicht maligne lymphohämatopoetische Zellen mit einer hohen Effizienz transduzieren (Dilloo et al., 1997). Auch der Gebrauch von herpesviralen Amplikons für den Gentransfer in humane lymphohämatopoetische Zellen verschiedener Linien wurde erforscht. Da die meisten Amplikonsysteme vom HSV-1 hergeleitet werden, wurde der Bereich der Infektiosität der HSV-1-Amplikons in lymphohämatopoetischen Zelllinien und humanen Knochenmarkzellen verschiedener Linien getestet. Es stellte sich heraus, dass aufgrund der bereits genannten Eigenschaften der HSV-Vektorsysteme (Kapitel 1.4.2) diese besonders für eine hohe Gentransfereffizienz sowohl in nicht maligne als auch in maligne primäre hämatopoetische Zellen geeignet sind. In lymphatischen Zelllinien konnte eine Gentransferrate von 50 bis 70% gezeigt werden. In der KG1a-Zelllinie, die einer myeloischen Entwicklungslinie entstammt und als Modell für die primären Stammzellen eingesetzt werden kann, konnte eine Gentransferrate von 25 bis 50% nachgewiesen werden.

Ähnlich ließen sich auch primäre humane myeloische Knochenmarkzellen mit hoher Effizienz transduzieren (Coffin et al., 1998; Dilloo et al., 1997; Thomassen et al., 2001; Tolba et al., 2001; Zibert et al., 1999; Zibert et al., submitted; Zibert et al., 2000; Zibert et al., 2001).

Auch die in dieser Arbeit verwendeten lymphohämatopoetischen Zelllinien konnten mit einer hohen Transduktionseffizienz von bis zu 80% bei gleichzeitig niedriger Toxizität (< 20%) mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV transduziert werden (Abb. 11, Abb. 12). Beim Vergleich der Transduktionseffizienz des auf dem HSV-1-basierenden Standardamplikonvektors HSV mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wurde deutlich, dass unabhängig von der Vektormenge mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV eine zwei- bis dreifach höhere initiale Transduktionseffizienz erreicht wurde als mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor (Abb. 14). Dies könnte auf eine wesentlich geringere Zytotoxizität des HSV-1-Standardamplikonvektors aufgrund der nicht vorhandenen Rep-Proteine zurückzuführen sein.

Hinsichtlich dieser Ergebnisse scheint der HSV/AAV-Hybridamplikonvektor schlechter für die Gentherapie geeignet zu sein. Es muss aber berücksichtigt werden, dass die bei diesem Vektorsystem vorhandenen Rep-Proteine zwar zu einer erhöhten Zytotoxizität führen und somit wahrscheinlich zu einer geringeren initialen Transduktionseffizienz, diese Rep-Proteine aber gleichzeitig für eine ortsspezifische Integration des Transgens in das Wirtszellgenom benötigt werden, was eine sehr wichtige Ausgangsbasis für eine erfolgreiche Langzeit-Gentherapie darstellt.

Der in dieser Arbeit verwendete HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV unterscheidet sich vom HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV#, welcher von Heister et al. (Heister et al., 2002) verwendet wurde, durch eine Punktmutation am Translationsstartcodon des AAV-Rep-Gens (ATG → ACG). Diese Punktmutation wurde in der Absicht vorgenommen, die Rep-bedingte Zytotoxizität des HSV/AAV-Hybridamplikonvektors HSV/AAV# zu minimieren. Durch die Punktmutation sollte die

Expression von Rep78 und Rep68 minimiert, nicht aber vollständig ausgeschaltet werden, mit dem Ziel eine niedrigere Rep-bedingte Zytotoxizität und somit eine höhere initiale Transduktionseffizienz zu erreichen, gleichzeitig aber auch weiterhin die Integration in das Wirtszellgenom zu ermöglichen. Eine Translation adeno-assoziiierter Virusproteine durch Initiation über die ACG- anstelle der ATG-Sequenz scheint dabei nicht außergewöhnlich, da für das adeno-assoziierte Virusstrukturprotein B ebenfalls die Nukleotidsequenz „ACG“ als einzigartiger eukaryontischer Translationsstartpunkt beschrieben worden ist (Becerra et al., 1988).

Obwohl die Transduktionseffizienz nach Transduktion mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV# und dem in dieser Arbeit verwendeten punktmutierten HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV annähernd vergleichbar war, konnte auf mRNA-Level mithilfe einer RT-PCR dargestellt werden, dass die Expression von AAV-Rep nach Transduktion von 293-Zellen mit HSV/AAV weiterhin vorhanden, aber diskret geringer war als nach Transduktion der 293-Zellen mit HSV/AAV# (Abb. 19). Somit konnte durch den durchgeführten Basenaustausch im Translationsstartcodon von AAV-Rep eine geringe Verbesserung der HSV/AAV-Konstrukte in Form einer Verminderung der Rep-Expression erreicht werden.

Surosky et al. (Surosky et al., 1997) zeigten, dass die Rep-Expression zwei Tage nach der AAV-Infektion ihr Maximum erreicht und dann langsam abnimmt, wobei schon geringe Mengen des Rep-Proteins für die Vermittlung einer ortsspezifischen Integration ausreichen. Eine Erhöhung der Rep-Menge führt dabei nicht zwangsläufig zu einem Anstieg der Integrationsraten. Die Anzahl der vorhandenen Rep-Moleküle 24 h nach einer latenten Infektion mit AAV reichen bereits aus, um mit allen Rep-Bindungsstellen des humanen Genoms zu interagieren (Young et al., 2000). Ob eine spezifische Integration in das Wirtszellgenom mit HSV/AAV trotz einer Minimierung der Rep-Proteine möglich ist, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit noch abgeklärt werden.

AAV-Vektoren sind in der Lage, Langzeitexpressionen zu vermitteln (Davidson et al., 2000; Halbert et al., 2000; Pruchnic et al., 2000). Eine langanhaltende Transgenexpression

konnte bereits ohne toxische und immunologische Nebenwirkungen *in vivo* beobachtet werden (Monahan et al., 2002). Sie dauerte bis zu zwei Jahre in Mäusen und mehrere Monate in Hunden, nicht-humanen Primaten und im Menschen an (Conrad et al., 1996; Donahue et al., 1999; Linden und Woo, 1999; Wagner et al., 1998). Es konnte dabei sowohl in der Leber (Snyder et al., 1997), im Auge (Guy et al., 1999), in der Lunge (Halbert et al., 2000), im Skelettmuskel (Pruchnic et al., 2000) als auch im Gehirn (Davidson et al., 2000) eine Langzeitexpression des Transgens nachgewiesen werden.

Auch mit den ersten HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren konnte bereits eine vergleichbare Transgenexpression erzielt werden, was einen ersten Schritt im Hinblick auf eine stabile Transduktion von Zielzellen bedeutet (Costantini et al., 1999; Fraefel et al., 1997; Johnston et al., 1997).

Im Hinblick auf korrektive gentherapeutische Behandlungsansätze (Langzeit-Gentherapie) sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob auch mit dem in dieser Arbeit verwendeten HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV eine langanhaltende Transgenexpression erreicht werden kann und ob eine ortsspezifische Integration mit diesem Vektor möglich ist.

In den FACS-Auswertungen zeigte sich im Laufe dieser Arbeit, dass innerhalb der ersten drei Wochen nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV die GFP-Expression stark abnahm (Abb. 17), was zunächst auf einen Verlust transgentragender Zellen schließen lässt. Durch die Bestimmung der absoluten Zellzahl an GFP⁺-Zellen im gleichen Zeitraum stellte sich aber heraus, dass die Zahl transgentragender GFP⁺-Zellen bei beiden Vektoren deutlich zunahm, geringer jedoch bei dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV (Abb. 18). Folglich kann die Abnahme der Transgenexpression bei den FACS-Analysen durch das exponentielle Wachstum der Zellen erklärt werden, wodurch es im späteren Verlauf aufgrund der in der Überzahl vorliegenden GFP⁻-Zellen zu einer scheinbaren Abnahme der GFP⁺-Zellen kommt.

Obwohl es zu einer Abnahme der GFP-Expression kommt, kann eine über drei Wochen anhaltende transiente Genexpression beobachtet werden (Abb. 17). Diese ist auf den

sogenannten „rollenden Replikationsmechanismus“ der HSV-Amplikons zurückzuführen, der die Einschleusung vieler Kopien des genetischen Materials in die Zielzellen durch die Viruspartikel ermöglicht, so dass auch bei hohen Zellteilungsraten viele transgtragende Plasmide an die Tochterzellen weitergeben werden können. Das HSV/AAV-Hybridamplikonsystem ermöglicht somit aufgrund der multiplen episomalen Partikel in den Zielzellen auch ohne Integration des Transgens in das Genom der Zellen eine länger andauernde Transgenexpression und erfüllt somit die Kriterien einer gentherapeutischen Anwendung, wie sie beispielsweise im Bereich der Vakzinierung benötigt werden.

Nachdem eine über mehrere Wochen andauernde transiente Transgenexpression nach Transduktion der Zielzellen dargestellt werden konnte, wurde im Anschluss untersucht, ob auch eine Integration ins Genom der Zielzellen stattgefunden hat. Ca. 70% der Integrationsereignisse nach einer Infektion mit dem Wildtyp-AAV erfolgen auf Chromosom 19 (Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991). Bei den mit dem Wildtyp-Virus durchgeführten Arbeiten wird in der Regel nicht die ortsspezifische Integrationsfrequenz betrachtet, sondern die Gesamtintegrationsfrequenz. Berns et al. (Berns et al., 1975) erreichten eine Gesamtintegrationsfrequenz von 30%, Laughlin et al. (Laughlin et al., 1986) erzielten eine Integrationsrate von 7 bis 14%. 1996 gelang es Kearns et al. (Kearns et al., 1996) in 59% latent infizierter bronchialer Epithelzellen eine AAV-Integration nachzuweisen, 94% davon spezifisch auf dem humanen Chromosom 19.

Die Transgene von AAV-abgeleiteten rekombinanten Vektoren persistieren dagegen meist episomal in der Zelle (Russell, 2003). Selten integriert rekombinantes AAV aber auch unspezifisch in das Genom primärer Zellen. Diese Integrationsstellen können dabei in der Nähe aktiv transkribierter Gene liegen (Miller et al., 2002; Nakai et al., 2003). Eine ortsspezifische Integration ist nach Infektion mit rekombinanten AAV möglich, bei denen *cap* deletiert und durch ein Transgen ersetzt wurde (Shelling and Smith, 1994) oder Rep in *trans* zugeführt wird. Plasmide, die eine von ITRs flankierte Expressionskassette enthalten, integrieren, wenn sie Rep tragen oder mit einem Rep-kodierenden Plasmid in humane Zellen kotransfiziert werden. In einer Reihe von Arbeiten wurde die Frequenz der

ortsspezifischen Integration rekombinanter AAV bezogen auf die Gesamtintegrationsrate untersucht. Wurde AAV-Rep wie in dieser Arbeit außerhalb der ITRs in *cis* bereitgestellt, lag die Frequenz der ortsspezifischen Integration zwischen 7 und 25% (Pieroni et al., 1998), 22 und 24% (Lamartina et al., 1998) sowie bei 38% (Balague et al., 1997). Lag das Rep-Gen innerhalb der AAV-ITRs, lag die ortsspezifische Integrationsrate bei 61% (Tsunoda et al., 2000).

Eine ortsspezifische genomische Transgenintegration in die AAVS1-site durch HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren konnte von Heister et al. und Wang et al. (Heister et al., 2002; Wang et al., 2002) dokumentiert werden.

Wie auch bei dem AAV-Wildtyp schien die Frequenz der gezielten Integration von dem Zielzelltyp abzuhängen (Kotin et al., 1990; Wang et al., 2002) und zeigte in bezug auf die Gesamtintegrationsrate eine Integrationsquote zwischen 40 und 80%. Zu den Zielzellen, in denen bisher eine ortsspezifische Integration in das humane Chromosom 19 nach einer Transduktion mit HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren nachgewiesen werden konnte, gehören die HeLa Zellen, die humane embryonale Nierenzelllinie 293 und eine Glioblastom-Zelllinie. Die einzigen primären humanen Zellen, die bisher unter diesem Aspekt untersucht wurden, sind Myeloblasten (Wang et al., 2002).

Um zu klären, ob nach Transduktion mit dem in dieser Arbeit verwendeten HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV eine ortsspezifische Integration erreicht werden kann, wurde die etablierte 293-Zelllinie, aus der bereits eine stabile GFP⁺-Linie generiert werden konnte (Heister et al., 2002), transduziert. Zur Anreicherung der Zellen mit einem oder mehreren möglichen Integrationsereignissen wurden Einzelzellklonierungen durchgeführt (Kapitel 4.6.1). Dabei gelang es erstmalig, stabile GFP⁺-Einzelzellklone nach Transduktion mit einem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor ohne vorherige Anreicherung der GFP⁺-Zellen über eine Antibiotikaresistenz oder das Sorten über FACS zu isolieren.

Neben den Einzelzellklonierungen nach Transduktion der 293-Zellen mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wurden zusätzlich Einzelzellklonierungen nach einer Doppeltransduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV sowie HSV/AAV

durchgeführt. Mit diesem Versuchsansatz sollte ein Modell untersucht werden, bei dem neben initial hohen Transduktionseffizienzen, die für Gentherapieansätze wie zum Beispiel Vakzinierungen essenziell sind, gleichzeitig auch eine Integration des Transgens möglich ist, wie sie für korrektive gentherapeutische Ansätze benötigt wird.

Sowohl von den einfach transduzierten als auch von den doppelt transduzierten Ansätzen konnten stabile GFP⁺-Einzelzellklone isoliert werden. Wie erwartet lag die initiale Transduktionseffizienz nach der Doppeltransduktion 5 bis 10% höher als bei den anderen Transduktionsansätzen. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen kam es in den doppelt transduzierten Ansätzen wahrscheinlich zu einem Verlust von ca. 50% der GFP⁺-Einzelzellklone, was teilweise daran lag, dass ein Teil der GFP⁺-Zellen aus der Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV hervorging und daher nur transient vorlag, teilweise aber auch durch die höhere vektorbedingte Zytotoxizität nach der Doppeltransduktion erklärt werden könnte.

Zur genaueren Untersuchung der Integrationsereignisse wurde eine PCR etabliert, mit deren Hilfe das Vorhandensein des Transgens GFP im Genom der Zielzelle nachgewiesen werden sollte (Abb. 23). Dabei konnte in allen 293-Einzelzellklonen mit einer stabilen GFP-Expression das Transgen in den Zellen nachgewiesen werden. 73% der GFP⁺-Klone zeigten neben der GFP-Bande auch eine AAV-Rep-Bande. Der gleichzeitige Nachweis von AAV-Rep weist entweder auf eine unspezifische Integration hin, bei der die Integration außerhalb der AAVS1-site stattgefunden haben kann oder größere Teile des Plasmids innerhalb der AAVS1-site integriert wurden, oder auf ein episomales Vorliegen des Plasmids.

Neben der ITR-spezifischen Integration des Transgens könnte die Integration in diesen Ansätzen über den p5-Promotor (p5IEE) stattgefunden haben, welcher völlig ausreichend für die Integration des Transgens in das Chromosom 19 ist (Philpott et al., 2002). In diesem Fall müsste der Bereich zwischen dem p5-Promotor und dem ITR integriert sein, was neben dem Nachweis von GFP auch den gleichzeitigen Nachweis von AAV-Rep in den Zielzellen erklären würde.

Zum Nachweis einer ortsspezifischen Integration in die AAVS1-site des humanen Chromosoms 19 mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV wurde eine Southern Blot-Analyse bei stabilen 293-Einzelzellklonen mit einer GFP-Expression von über 70% durchgeführt.

Eine ortsspezifische Integration der Transgenkassette (Abb. 26) konnte für den Klon 7' und den Klon 34 durch eine Ko-Hybridisierung und –Migration sowohl mit der AAVS1- als auch mit der GFP-Sonde gezeigt werden. Das Auftreten der zusätzlichen 8,2 kb Bande im AAVS1-Blot lässt bei diesen beiden Klonen vermuten, dass nicht bei allen Zellen eine Integration erfolgt ist. So könnte die Integration des Transgens in das Genom der Wirtszelle erst nach einigen Zellteilungen eingetreten sein, wodurch die zunächst episomal vorliegenden Plasmide in manchen Zellen bereits verloren gingen. Diese Vermutung wird dadurch verstärkt, dass bei keinem der vorliegenden Einzelzellklone 100% der Zellen GFP+ sind. Als weitere mögliche Ursache kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Einzelzellklonierung durch Zellaussaat in hoher Verdünnung auch nicht GFP+-Zellen mit isoliert wurden.

Bei den restlichen vier Klonen 66, 68, 13' und 57 konnte mit der Southern Blot-Methode keine AAVS1- spezifische Integration nachgewiesen werden (Abb. 27, Abb. 28). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich auch eine AAVS1-spezifische Integration in dem DNA-Bereich, an den die AAVS1-Sonde hybridisiert, stattgefunden haben könnte, wodurch eine Detektion nicht mehr möglich wäre. Die bisher beschriebenen Integrationsstellen in der AAVS1-site im Chromosom 19 stärken diese Annahme, da Integrationen in einem Bereich von mehreren hundert bzw. tausend Basenpaaren gefunden wurden (Abb. 2). Zur Klärung dieser Fragestellung könnte eine AAVS1-spezifische nested PCR Aufschluss geben. Auch die Etablierung einer Lam-PCR (linear amplification mediated polymerase chain reaction), mit der alle Integrationsstellen im gesamten Genom bestimmt und analysiert werden können (Schmidt et al., 2002), wäre zur genaueren Abklärung sinnvoll.

Zusammenfassend ist zu vermerken, dass bei der Einzelzellklonierung nach Transduktion der Zellen mit HSV/AAV Hybridamplikonvektoren 7% der Einzelzellklone bis zur 3./4. Woche n.K. GFP positiv waren (Tab. 4). 44% dieser GFP+-Klone zeigten auch in der 15./17. Woche n.K. noch eine GFP-Expression. Für den Nachweis des Transgens GFP und des Rep-Gens auf DNA-Ebene wurden 14 der 293-Einzelzellklone ausgewählt (Abb. 23). In allen 11 Klonen mit einer detektierbaren GFP Expression konnte sowohl das Transgen GFP als auch Rep mittels PCR nachgewiesen werden. 6 der 293-Einzelzellklone, bei denen mindestens 70% der Zellen eine Langzeit Expression von GFP zeigten, wurden zusätzlich mit der Hilfe der Southern Blot Analyse auf eine AAVS1-spezifische Integration untersucht. Dabei konnte in zwei Klonen eindeutig eine AAVS1-spezifische Integration nachgewiesen werden. Bei den verbliebenen vier Klonen kann aufgrund des Bandenmusters der Southern Blot Analyse nur eine Integration außerhalb der AAVS1-Stellen oder eine episodale Persistenz postuliert werden.

Im Vergleich dazu gelang es Liu et al. (Liu et al., 2006) mit einem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor und einer über die Cre Rekombinase regulierbaren Rep-Expression in 22 % der transduzierten 293-Zellen eine stabile Genexpression nachzuweisen. In 70% dieser Zellen lag laut Southern Blot-Analyse eine AAVS1-spezifische Integration vor

Nachdem spezifische und unspezifische Integrationen mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV in 293-Zellen nachgewiesen werden konnten, sollten im Anschluß humane hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen als Zielzellen untersucht werden. Aufgrund ihrer Langlebigkeit und ihrer Fähigkeit, alle Blutzelllinien zu rekonstruieren, sind primäre hämatopoetische Stammzellen wichtige Zielzellen für die Gentherapie (Emery et al., 2002; To et al., 1997). Sie eignen sich aber nicht nur wegen ihrer guten Regenerationsfähigkeit zur somatischen Gentherapie, sondern auch aufgrund ihrer Zugänglichkeit und Anreicherungsmöglichkeit *ex vivo* und der Möglichkeit der genetischen Manipulation. In murinen hämatopoetischen Stammzellen konnte nach Transduktion mit rekombinanten AAV-Vektoren, die das Neomycin Resistenzgen unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren enthielten, im „colony forming assay“ nach

Geneticinselektion eine Transduktionseffizienz von 1,5% (LaFace et al., 1988) bis 80% (Zhou et al., 1993) erreicht werden.

Die erste erfolgreiche Transduktion von humanen hämatopoetischen CD34+-Stammzellen mit rekombinanten AAV-Vektoren wurde von Zhou et al. (Zhou et al., 1994) durchgeführt und konnte danach bereits mehrfach wiederholt werden (Fisher-Adams et al., 1996; Goodman et al., 1994; Luhovy et al., 1996; Miller et al., 1994; Walsh et al., 1994). Die Daten über den Gentransfer in humane hämatopoetische Zielzellen mittels AAV-hergeleiteter Vektoren sind dennoch widersprüchlich. Einige Untersuchungen ergaben einen effizienten Gentransfer und eine ausgedehnte Genexpression bis zu 9 Wochen nach Transduktion von humanen hämatopoetischen CD34+-Stammzellen mit herkömmlichen AAV-Vektoren mit fehlender Rep-Expression (Chatterjee et al., 1999; Fisher-Adams et al., 1996). Andere dagegen zeigten eine variable Transduktionsrate und eine schnell abnehmende Transgenexpressionsquote (Alexander et al., 1997; Nathwani et al., 2000; Ponnazhagan et al., 1997). Im *in vivo* Mauss-Modell konnte ein stabiler Gentransfers in murine hämatopoetische Stammzellen mit AAV Vektoren bereits dokumentiert werden (Zhong et al., 2006).

Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Transduktion von humanen CD34+-Stammzellen mit HSV-Amplikonvektoren ist das Vorhandensein der sogenannten Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren, die das Eindringen von Herpes simplex Viren in Säugetierzellen ermöglichen (Geraghty et al., 1998; Herold et al., 1994). Herpes Virus Entry (Hve)-Rezeptoren sind Membranproteine, die nach dem initialen Andocken von HSV an die Proteoglycane der Zelloberfläche für das virale Eindringen in die Zielzellen erforderlich sind. Während für die meisten HSV-2-Typen HveB zuständig ist, scheinen für die meisten HSV-1-Typen HveA und HveC die vorherrschenden Rezeptoren zu sein (Geraghty et al., 1998). Vor der Transduktion der isolierten humane CD34+-Stammzellen mit den HSV-1- Amplikonvektoren wurde in unserem Labor die Genexpression der Hve-Rezeptoren dieser Zellen mittels einer RT-PCR-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass angereicherte humane CD34+-Stammzellen alle drei Hve-Rezeptoren exprimieren, was

darauf hindeutet, dass diese Stammzellen gleichermaßen empfänglich für HSV-1- und HSV-2-hergeleitete Vektoren sind (Abb. 29).

Unreife humane CD34⁺-Stammzellen lassen sich zwar leicht isolieren, aber nur schwer kultivieren, da die notwendige Zugabe von Cytokinen zu einer Ausreifung der Zellen führt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden daher zunächst einleitende Transduktionsexperimente mit lymphohämatopoetischen Zelllinien durchgeführt (Kapitel 4.4). Dabei zeigte sich, dass nach Transduktion der humanen T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat und der myeloischen Leukämiezelllinie KG1a sowohl mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV als auch mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV 24 h nach der Transduktion initiale Transduktionseffizienzen von 50 bis 70% erreicht wurden (Abb. 16). Die Transgenexpression konnte nach Transduktion der beiden Zelllinien sowohl mit HSV als auch mit HSV/AAV bis zum 12. Tag nach der Transduktion gleich hoch gehalten werden (Abb. 17), was sich auf die Besonderheit der Amplikonplasmide, mehrere Plasmidkopien pro Zelle zu tragen, zurückführen lässt.

Nachdem ein effizienter Gentransfer in frisch isolierte humane CD34⁺-Stammzellen mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV bereits nachgewiesen werden konnte (Müller, 2004), konnte nun dokumentiert werden, dass ein effizienter Gentransfer auch mit HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren möglich ist (Abb. 30). Die Gentransferrate bzw. die Transduktionseffizienz von ca. 20% war dabei mit der Transduktionseffizienz nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV vergleichbar. Nathwani et al. (Nathwani et al., 2000) beschrieben dagegen, dass frisch isolierte CD34⁺-Zellen nur sehr schlecht transduziert werden können (weniger als 4%), während nach der Stimulation der Zellen mit Zytokinen eine Transduktionseffizienz von 21 bis 25 % erreicht werden kann.

Wurde die Transgenexpression über einen Zeitraum von ca. 2 Wochen betrachtet (Abb. 31), zeigte sich, dass sowohl nach Transduktion der humanen CD34⁺-Stammzellen mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV als auch nach Transduktion mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV zunächst ein Verlust der Transgenexpression stattfand. Da dennoch eine länger als 10 Tage anhaltende Transgenexpression erreicht werden konnte,

wurde wie auch schon bei den 293-Zellen eine Bestimmung der absoluten Zellzahl an GFP+-Zellen durchgeführt (Abb. 33). Es stellte sich heraus, dass in der ersten Woche nach der Transduktion zwar eine Abnahme der Transgenexpression bezogen auf die Gesamtzellzahl vorlag, die absolute Anzahl an lebenden GFP+-Zellen aber konstant blieb (HSV) oder zunahm (HSV/AAV). Eine mögliche Ursache dafür liegt in einer langsameren Proliferation der transduzierten Zellen im Verhältnis zu den nicht transduzierten Zellen.

Humane mesenchymale Stammzellen (MSZ) sind aufgrund ihrer hohen Migrationsfähigkeit, die den Einsatz der MSZ als Trägersysteme für die Übertragung von Transgenen in der Gentherapie ermöglicht, sowie aufgrund ihrer großen Differenzierungsmöglichkeiten in reife Zellen vieler mesenchymaler Gewebe wie Knorpel-, Knochen- und Fettgewebe (Herzog et al., 2003; Pittenger et al., 1999; van Damme et al., 2002) wichtige Zielzellen für die Gentherapie. Der therapeutische Gentransfer in MSZ konnte für eine Anzahl von monogenetischen Erkrankungen nach Gebrauch von meist murinen onkoretroviralen Vektoren bereits gezeigt werden (Baxter et al., 2002; Cherington et al., 1998; Chiang et al., 1999; Chuah et al., 2000; Niyibizi et al., 2001; Takenaka et al., 1999). Generationen von MSZ aus Knochenmarkproben exprimieren das typische durchflusszytometrische Markerprofil sowie alle drei für die Transduktion mit HSV-Vektoren erforderlichen herpesviralen Rezeptoren HveA, HveB und HveC, was durch die Arbeitsgruppe von Dilloo bereits dokumentiert werden konnte. In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass MSZ sehr empfänglich für die Transduktion mit HSV-Amplikonvektoren sind. Nach Transduktion mit dem HSV-1-Standardamplikonvektor HSV und dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV lag die Transduktionseffizienz 24 h nach der Transduktion bei ca. 90% (Abb. 34, Abb. 35), also wesentlich höher als nach Transduktion der humanen hämatopoetischen CD34+-Stammzellen, wie es auch von Sun et al. (Sun et al., 2006) beschrieben wurde.

Es zeigte sich aber, dass die Toxizität nach Transduktion mit HSV/AAV bei 36% lag und dreimal so hoch war wie die Toxizität nach Transduktion mit HSV. Dieses Ergebnis könnte auf eine höhere Empfindlichkeit der MSZ gegenüber den AAV-Rep-Proteinen

zurückzuführen sein. Bei Betrachtung der Transgenexpression über einen längeren Zeitraum zeigte sich, dass mit beiden Vektoren eine über vier Wochen lang anhaltende Transgenexpression von 3 bis 4% erreicht werden konnte (Abb. 36). Der anfänglich hohe Verlust der transgenexprimierenden Zellen lässt sich in diesem Fall mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Soforttoxizität durch den Vektor zurückführen.

Sowohl für die gentherapeutische Vakzinierung als auch für korrektive gentherapeutische Ansätze stellt die erfolgreiche Transduktion von humanen hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen mit HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren eine wichtige Grundlage dar. Obwohl eine transiente Transgenexpression über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen für eine gentherapeutische Vakzinierung bereits ausreicht, sollte eine stabile Transgenexpression angestrebt werden, um mit Hilfe von korrektiven gentherapeutischen Ansätzen die normale Funktion deletierter oder mutierter Gene durch das Einbringen des entsprechenden funktionierenden Gens dauerhaft wieder herstellen zu können.

Um die Transduktionseffizienz in humanen hämatopoetischen CD34+-Stammzellen und somit im Weiteren die Wahrscheinlichkeit eines Integrationsereignisses zu erhöhen, wäre eine Anwendung von Hydroxyurea möglich, wie es von Ju et al. (Ju et al., 2004) und Sun et al. (Sun et al., 2006) beschrieben wurde. Es gelang Sun et al., die Transduktionseffizienz nach der Vorbehandlung der CD34+-Stammzellen mit Hydroxyurea gegenüber den unbehandelten CD34+-Stammzellen um 8% zu steigern.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Humane hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen sind attraktive Zielzellen für die Gentherapie. Eines der Hauptprobleme des stabilen Gentransfers in Zellen ist die durch zufällige chromosomale Integration verursachte maligne Transformation. Die adeno-assoziierten Viren (AAV) sind die einzigen integrierenden Viren, die eine spezifische Integration vermitteln. In den vergangenen Jahren wurden hybride HSV/AAV-Amplikonvektoren entwickelt, die Elemente der Herpes simplex Viren-Typ 1 (HSV-1) und der AAV-Typ 2 miteinander vereinen. Die große Verpackungskapazität des HSV-Amplikonvektors ermöglicht die Verpackung der essentiellen AAV-Elemente für die spezifische Integration und des Transgens in *cis* im gleichen Vektor. Verpackt in die herpesvirale Hülle transduzieren die Vektoren mit hoher Effizienz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst einleitende Transduktionsexperimente mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV durchgeführt, welcher das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) exprimiert, das zwischen den AAV-ITRs lokalisiert ist. Nach Transduktion verschiedener lymphohämatopoetischer Zelllinien konnte die höchste Transduktionseffizienz von ca. 70% in der den Stammzellen am nächsten stehenden humanen myeloischen Leukämiezelllinie KG1a beobachtet werden. In der humanen T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat lag die Transduktionseffizienz nach Transduktion mit der gleichen Vektormenge bei ca. 40%. Die Transgenexpression war in beiden Zelllinien nach der Transduktion über 6 Tage stabil und nahm dann zügig ab. In der humanen Nierenzelllinie 293, die als Modellzelllinie zur Integrationsanalyse eingesetzt wurde, lag die Transgenexpression nach Transduktion mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV am 91. Tag nach der Transduktion noch bei annähernd 30%.

Es gelang nach Transduktion der humanen Nierenzelllinie 293 mit HSV/AAV stabile 293-Einzelzellklone zu kultivieren und in 2 der ausgewählten hochexprimierenden GFP⁺-Klone eine spezifische Integration in die AAVS1-site des humanen Chromosoms 19 darzustellen.

In humanen hämatopoetischen CD34+-Stammzellen ließ sich eine Gentransferrate von 20% erzielen. Nach 10 Tagen lag die Transgenexpression zwar nur bei 1 bis 2% der Zellpopulation, jedoch verdreifachte sich die absolute Anzahl an GFP exprimierenden CD34+-Zellen aufgrund der Proliferation der CD34+-Zellen..

Neben den hämatopoetischen CD34+-Stammzellen wurden mesenchymale Stammzellen (MSZ) untersucht. Nach Transduktion der MSZ mit dem HSV/AAV-Hybridamplikonvektor HSV/AAV konnte eine hohe Transduktionsrate von ca. 90% mit einer niedrigen Zielzelltoxizität erreicht werden. Nach 15 Tagen konnte nach Transduktion mit dem HSV/AAV noch eine Transgenexpression von 22% gezeigt werden, die bis zum 33. Tag bei 3 bis 4 % lag.

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass hybride HSV/AAV-Amplikonvektoren mindestens über 2 Wochen anhaltende stabile Transgenexpression in hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen ermöglichen.

7 SUMMARY

Human hematopoietic and mesenchymal stem cells are attractive target cells for gene therapy approaches. One of the major concerns of stable gene transfer into cells is malignant transformation mediated by random chromosomal integration. Among the integrating vectors the adenovirus associated viruses (AAV) alone are capable of site-specific integration. Recently, a novel HSV/AAV hybrid amplicon vector has been developed combining the unique features of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and AAV-type 2 vectors. The large packaging capacity of HSV amplicon vectors for the first time facilitates an assembly of the essential AAV elements for site-specific integration and the transgene on one vector in *cis*. Packaged in the herpesviral coat and tegument, the vectors are capable of high efficiency viral entry.

In this work preliminary transduction experiments with the HSV/AAV hybrid amplicon vector HSV/AAV expressing the green fluorescent protein located between the AAV-derived ITRs were performed first.

After transduction of different lymphohaematopoietic cell lines the highest gene transfer rate of approximately 70% was observed in the stem cell related human myeloid leukaemia cell line KG1a. In the human T-cell leukaemia line Jurkat a gene transfer rate of approximately 40% was achieved following transduction with the same vector dose. After transduction in both cell lines transgene expression was stable for 6 days and rapidly decreased afterwards. In comparison the transgene expression in hybrid amplicon vector-transduced 293 cells reached nearly 30% until 91 days after transduction. Cultivation of stable GFP+ 293 cell clones was achieved after transduction with the HSV/AAV hybrid amplicon vector HSV/AAV and a site-specific integration in the human chromosome 19 in 2 of the clones with the highest GFP-expression level was shown.

In the initial experiments in primary human hematopoietic CD34+ cells a gene transfer rate of 20% was obtained. 10 days after transduction a transgene expression of 1-2 % was achieved, however, the absolute cell count of GFP expressing CD34 cells tripled by proliferation of CD34 cells within one week.

SUMMARY

In addition to CD34⁺ hematopoietic progenitor cells, mesenchymal stem cells were investigated a high transduction rate of approx. 90 could be achieved with a low cytotoxicity. A stable transgene expression of 22% was maintained for 15days.

Taken together, these data demonstrate, that HSV/AAV hybrid amplicon vectors mediate stable transgene expression for at least two weeks in human hematopoietic and mesenchymal stem cells.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Alexander, I. E., D. W. Russell , and A. D. Miller (1997). Transfer of contaminants in adeno-associated virus vector stocks can mimic transduction and lead to artifactual results. *Hum Gene Ther.* **8**, 1911-20.

Anderson, W. F., R. M. Blaese, and K. Culver (1990). The ADA human gene therapy clinical protocol, July 6, 1990. *Hum Gene Ther.* **1**, 331-62.

Asahara, T., C. Kalka, and J. M. Isner (2000). Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.* **7**, 451-7.

Ausubel, J. H. (1992). Industrial ecology: reflections on a colloquium. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**, 879-84

Balague, C., M. Kalla, and W.-W. Zang (1997). Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J Virol.* **71**, 3299-306.

Baxter, M. A., R. F. Wynn, J. A. Deakin, I. Bellantuono, K. G. Edington, A. Cooper, G. T. Besley, H. J. Church, J. E. Wraith, T. F. Carr, and L. J. Fairbairn (2002). Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I. *Blood.* **99**, 1857-9.

Becerra, S. P., F. Koczot, P. Fabisch, J. A. Rose (1988). Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol.* **62**, 2745-54.

Berns, K. I., and C. Giraud (1996). Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* **218**, 1-23.

Berns, K. I., T. C. Pinkerton, G. F. Thomas, M. D. Hoggan (1975). Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virol.* **68**, 556-60.

Blaese, R. M., K. W. Culver, A. D. Miller, C. S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, J. J. Greenblatt, S. A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C. A. Mullen, W. J. Ramsey, L. Muul, R. A. Morgan, W. F. Anderson (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* **270**, 475-80.

Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist, and A. Fischer (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. **288**, 669-72.

Chatterjee, S., W. Li, C. A. Wong, G. Fisher-Adams, D. Lu, M. Guha, J. A. Macer, S. J. Forman, and K. K. Wong, Jr. (1999). Transduction of primitive human marrow and cord blood-derived hematopoietic progenitor cells with adeno-associated virus vectors. *Blood*. **93**, 1882-94.

Cherington, V., G. G. Chiang, C. A. McGrath, A. Gaffney, T. Galanopoulos, W. Merrill, C. B. Bizinkauskas, M. Hansen, J. Sobolewski, P. H. Levine, J. S. Greenberger, and D. R. Hurwitz (1998). Retroviral vector-modified bone marrow stromal cells secrete biologically active factor IX in vitro and transiently deliver therapeutic levels of human factor IX to the plasma of dogs after reinfusion. *Hum Gene Ther*. **9**, 1397-407.

Cheung, A. K. M., M. D. Hoggan, W. W. Hauswirth, K. I. Berns (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol*. **33**, 739-48.

Chiang, G. G., H. L. Rubin, V. Cherington, T. Wang, J. Sobolewski, C. A. McGrath, A. Gaffney, S. Emami, N. Sarver, P. H. Levine, J. S. Greenberger, and D. R. Hurwitz (1999). Bone marrow stromal cell-mediated gene therapy for hemophilia A: in vitro expression of human factor VIII with high biological activity requires the inclusion of the proteolytic site at amino acid 1648. *Hum Gene Ther*. **10**, 61-76.

Chuah, M. K., A. Van Damme, H. Zwinnen, I. Goovaerts, V. Vanslembrouck, D. Collen, and T. Vandendriessche (2000). Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. *Hum Gene Ther*. **11**, 729-38.

Church, G. M., W. Gilbert (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **81**, 1991-5.

Coffin, R. S., S. K. Thomas, N. S. Thomas, C. E. Lilley, A. R. Pizzey, C. H. Griffiths, B. J. Gibb, M. J. Wagstaff, S. J. Inges, M. H. Binks, B. M. Chain, A. J. Thrasher, K. Rutault, and D. S. Latchman (1998). Pure populations of transduced primary human cells can be produced using GFP expressing herpes virus vectors and flow cytometry. *Gene Ther*. **5**, 718-22.

Conrad, C. K., S. S. Allen, S. A. Afione, T. C. Reynolds, S. E. Beck, M. Fee-Maki, X. Barraza-Ortiz, R. Adams, F. B. Askin, B. J. Carter, W. B. Guggino, T. R. Flotte (1996). Safety of single-dose administration of an adeno-associated virus (AAV)-CFTR vector in the primate lung. *Gene Ther.* **3**, 658-68.

Costantini, L. C., D. R. Jacoby, S. Wang, C. Fraefel, X. O. Breakefield, and O. Isacson (1999). Gene transfer to the nigrostriatal system by hybrid herpes simplex virus/adeno-associated virus amplicon vectors. *Hum Gene Ther.* **10**, 2481-94.

Davidson, B. L., C. S. Stein, J. A. Heth, I. Martins, R. M. Kotin, T. A. Derksen, J. Zabner, A. Ghodsi, J. A. Chiorini (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 3428-32.

Dilloo, D., D. Rill, C. Entwistle, M. Boursnell, W. Zhong, W. Holden, M. Holladay, S. Inglis, and M. Brenner (1997). A novel herpes vector for the high-efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood.* **89**, 119-27.

Donahue, B. A., J. G. McArthur, S. A. Spratt, D. Bohl, C. Lagarde, L. Sanchez, B. A. Kaspar, B. A. Sloan, Y. L. Lee, O. Danos, R. O. Snyder (1999). Selective uptake and expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *J Gene Med.* **1**, 31-42.

Emery, D. W., T. Nishino, K. Murata, M. Fragkos, and G. Stamatoyannopoulos (2002). Hematopoietic stem cell gene therapy. *Int J Hematol.* **75**, 228-36.

Feng, D., J. Chen, Y. Yue, H. Zhu, J. Xue, W. W. Jia (2006). A 16 bp Rep binding element is sufficient for mediating Rep-dependent integration into AAVS1. *J Mol Biol.* **358**, 38-45.

Fisher-Adams, G., K. K. Wong Jr., G. Podsakoff, S. J. Forman, and S. Chatterjee (1996). Integration of adeno-associated virus vectors in CD34⁺ human hematopoietic progenitor cells after transduction. *Blood.* **88**, 492-504.

Forrester, A., H. Farrell, G. Wilkinson, J. Kaye, N. Davis-Poynter, and T. Minson (1992). Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol.* **66**, 341-8.

Fraefel, C., D. R. Jacoby, C. Lage, H. Hilderbrand, J. Y. Chou, F. W. Alt, X. O. Breakefield, and J. A. Majzoub (1997). Gene transfer into hepatocytes mediated by helper virus-free HSV/AAV hybrid vectors. *Mol Med.* **3**, 813-25.

Gaetano, R., P. G. A. Carmen (1999). Gene transfer technology in therapy. Current applications and future goals. *Stem cells.* **17**, 191-202.

Geraghty, R. J., C. Krummenacher, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and P. G. Spear (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science*. **280**, 1618-20.

Glorioso, J. C., N. A. DeLuca, D. J. Fink (1995). Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annual Review of Microbiology*. **49**, 675-710.

Goodman, S., X. Xiao, R. E. Donahue, A. Moulton, J. L. Miller, C. E. Walsh, N. S. Young, R. J. Samulski, A. W. Nienhuis (1994). Recombinant adeno-associated virus mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells. *Blood*. **84**, 1492-1500.

Guy, J., X. Qi, N. Muzyczka, W. W. Hauswirth (1999). Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch. Ophthalmol.* **117**, 929-37.

Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J. L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo, and A. Fischer (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. **348**, 255-6.

Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415-19.

Halbert, C. L., E. A. Rutledge, J. M. Allen, D. W. Russell, A. D. Miller (2000). Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol*. **74**, 1524-32.

Halene, S., D. B. Kohn (2000). Gene therapy using hematopoietic stem cells: Sisyphus approaches the crest. *Hum Gene Ther*. **11**, 1259-67.

Hargrove, P. W., E. F. Vanin, G. J. Kurtzman, A. W. Nienhuis (1997). High-level globin gene expression mediated by a recombinant adeno-associated virus genome that contains the 3'γ globin gene regulatory element and integrates as tandem copies in erythroid cells. *Blood*. **89**, 2167-75.

- Heister, T., I. Heid, M. Ackermann, and C. Fraefel** (2002). Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus hybrid vectors mediate site-specific integration at the adeno-associated virus preintegration site, AAVS1, on human chromosome 19. *J Virol.* **76**, 7163-73.
- Herold, B. C., R. J. Visalli, N. Susmarski, C. R. Brandt, and P. G. Spear** (1994). Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cell requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol.* **75 (Pt6)**, 1211-22.
- Herzog, E. L., L. Chai, and D. S. Krause** (2003). Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood.* **102**, 3483-93.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyritz, and M. K. Brenner** (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* **5**, 309-13.
- Hüser, D., R. Heilbronn** (2003). Adeno-associated virus integrates site-specifically into human chromosome 19 in either orientation and with equal kinetics and frequency. *J Gene Virol.* **84**, 133-137.
- Johnston, K. M., D. Jacoby, P. A. Pechan, C. Fraefel, P. Borghesani, D. Schuback, R. J. Dunn, F. I. Smith, and X. O. Breakefield** (1997). HSV/AAV hybrid amplicon vectors extend transgene expression in human glioma cells. *Hum Gene Ther.* **8**, 359-70.
- Jorgensen, C., F. Djouad, F. Apparailly, and D. Noel** (2003). Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Ther.* **10**, 928-31.
- Ju, X. D., S. Q. Lou, W. G. Wang, J. Q. Peng, H. Tian** (2004). Effect of hydroxyurea and etoposide on transduction of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cell by adeno-associated virus vectors. *Acta Pharmacol Sin.* **25**, 196-202.
- Kearns, W. G., S. A. Afione, S. B. Fulmer, M. G. Pang, D. Erikson, M. Egan, M. J. Landrum, T. R. Flotte, G. R. Cutting** (1996). Recombinant adeno-associated virus (AAV-CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Ther.* **3**, 748-55.
- Koc, O. N., S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, and H. M. Lazarus** (2000). Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.* **18**, 307-16.

- Koetsier, P. A., J. Schorr, W. Doerfler** (1993). A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern blotting of DNA. *Biotechniques*. **15**, 260-2.
- Kotin, R. M., M. Siniscalco, R. J. Samulski, X. D. Zhu, L. Hunter, C. A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi, and K. I. Berns** (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 2211-5.
- Krisky, D. M., D. Wolfe, W. F. Goins, P. C. Marconi, R. Ramakrishnan, M. Mata, R. J. Rouse, D. J. Fink, and J. C. Glorioso** (1998). Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons. *Gene Ther.* **5**, 1593-603.
- LaFace, D., P. Hermonat, E. Wakeland, A. Peck** (1988). gene transfer into hematopoietic progenitor cells mediated by an adeno-associated virus vector. *Virol.* **162**, 483-86.
- Lamartina, S., G. Roscilli, D. Rinaudo, P. Delmastro, C. Toniatti** (1998). Lipofection of purified adeno-associated virus Rep68 protein: toward a chromosome-targeting nonviral particle. *J Virol.* **72**, 7653-8.
- Laughlin, C. A., C. B. Cardellichio, H. C. Coon** (1986). Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J Virol.* **60**, 515-24.
- Linden, R. M., P. Ward, C. Giraud, E. Winocour, and K. I. Berns** (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 11288-94.
- Linden, R. M., S. L. Woo** (1999). AAVant-garde gene therapy. *Nat Med.* **5**, 21-2.
- Liu, Q., C. F. Perez, Y. Wang** (2006). Efficient site-specific integration of large transgenes by an enhanced herpes simplex virus/adeno associated virus hybrid amplicon vector. *J Virol.* **80**, 1672-79.
- Lozier, J. N., J. R. Yankaskas, W. J. Ramsey, L. Chen, H. Berschneider, R. A. Morgan** (1997). Gut epithelial cells as targets for gene therapy of hemophilia. *Hum Gene Ther.* **8**, 1481-90.
- Luhovy, M., S. McCune, J.-Y. Dong, J. F. Prchal, T. M. Townes, J. T. Prchal** (1996). Stable transduction of recombinant adeno-associated virus into hematopoietic stem cells from normal and sickle cell patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2**, 24-30.
- McLaughlin, S. K., P. Collis, P. L. Hermonat, N. Muzyczka** (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol.* **62**, 1963-73.

Mehrle S., V. Rohde, J. R. Schlehofer (2004). Evidence of chromosomal integration of AAV DNA in human testis tissue. *Virus Genes*. **28**, 61-9.

Miao, C. H., R. O. Snyder, D. B. Schowalter, G. A. Patijn, B. Donahue, B. Winther and M. A. Kay (1998). The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet*. **19**, 13-5.

Miller, D. G., E. A. Rutledge, and D. W. Russell (2002). Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet*. **30**, 147-8.

Miller, D. G., G. D. Trobridge, L. M. Petek, M. A. Jacobs, R. Kaul, D. W. Russell (2005). Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. *J Virol*. **79**, 11434-11442.

Miller, J. L., R. E. Donahue, S. E. Sellers, R. J. Samulski, N. S. Young, A. W. Nienhuis (1994). Recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated expression of human γ -globin gene in human progenitor-derived erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**, 10183-87.

Miller, N., R. Vile (1995). Targeted vectors for gene therapy. *FASEB J*. **9**, 90-9.

Monahan, P. E., K. Jooss, M. S. Sands (2002). Safety of adeno-associated virus gene therapy vectors: a current evaluation. *Expert Opin Drug Saf*. **1**, 79-91.

Morgan, R. A., R. M. Blaese (1999). Gene therapy: lessons learnt from the past decade. Interview by Clare Thompson. *BMJ*. **319**, 1310.

Müller, L. (2004). Gentransfer in lymphohämatopoetische Zellen, die Leber und die Muskulatur: Leukämievakzination und Genersatztherapie als mögliche Anwendung der HSV-1-Amplikonvektoren. Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie, Universität Düsseldorf. Ref Type: Dissertation.

Muzyczka, N., and K. I. Berns (2001). Parvoviridae: The viruses and their Replication, p. 2327-59. In *D. Knippe and R. Howley (ed.), Virology, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.*

Nakai, H., E. Montini, S. Fuess, T. A. Storm, M. Grompe, and M. A. Kay (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet*. **34**, 297-302.

Nathwani, A. C., H. Hanawa, J. Vandergriff, P. Kelly, E. F. Vanin, and A. W. Nienhuis (2000). Efficient gene transfer into human cord blood CD34+ cells and the CD34+CD38- subset using highly purified recombinant adeno-associated viral vector preparations that are free of helper virus and wild-type AAV. *Gene Ther*. **7**, 183-95.

Niyibizi, C., P. Smith, Z. Mi, C. L. Phillips, and P. Robbins (2001). Transfer of proalpha2(I) cDNA into cells of a murine model of human Osteogenesis Imperfecta restores synthesis of type I collagen comprised of alpha1(I) and alpha2(I) heterotrimers in vitro and in vivo. *J Cell Biochem.* **83**, 84-91.

Palombo, F., A. Monciotti, A. Recchia, R. Cortese, G. Ciliberto, and N. La Monica (1998). Site-specific integration in mammalian cells mediated by a new hybrid baculovirus-adeno-associated virus vector. *J Virol.* **72**, 5025-34.

Philpott, N. J., J. Gomos, K. I. Berns, and E. Falck-Pedersen (2002). A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 12381-5.

Philpott, N. J., J. Gomos, E. Falck-Pedersen (2004). Transgene expression after Rep-mediated site-specific integration into chromosome 19. *Hum Gene Ther.* **15**, 47-61.

Pieroni, L., C. Fipaldini, A. Monciotti, D. Cimini, A. Sgura, E. Fattori, O. Epifano, R. Cortese, F. Palombo, N. La Monica (1998). Targeted integration of adeno-associated virus-derived plasmids in transfected human cells. *Virol.* **249**, 249-59.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* **284**, 143-7.

Ponnazhagan, S., D. Erikson, W. G. Kearns, S. Z. Zhou, P. Nahreini, X. S. Wang, and A. Srivastava (1997). Lack of site-specific integration of the recombinant adeno-associated virus 2 genomes in human cells. *Hum Gene Ther.* **8**, 275-84.

Ponnazhagan, S., P. Mukherjee, X. S. Wang, K. Qing, D. M. Kube, C. Mah, C. Kurpad, M. C. Yoder, E. F. Srouf, and A. Srivastava (1997). Adeno-associated virus type 2-mediated transduction in primary human bone marrow-derived CD34+ hematopoietic progenitor cells: donor variation and correlation of transgene expression with cellular differentiation. *J Virol.* **71**, 8262-7.

Pruchnic, R., B. Cao, Z. Q. Peterson, X. Xiao, J. Li, R. J. Samulski, M. Epperly, J. Huard (2000). The use of adeno-associated virus to circumvent the maturation-dependent viral transduction of muscle fibers. *Hum Gene Ther.* **11**, 521-36.

Recchia, A., R. J. Parks, S. Lamartina, C. Toniatti, L. Pieroni, F. Palombo, G. Ciliberto, F. L. Graham, R. Cortese, N. La Monica, and S. Colloca (1999). Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 2615-20.

Ringe, J., C. Kaps, G. R. Burmester, M. Sittinger (2002). Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften*. **89**, 338-51.

Rizzuto, G., B. Gorgoni, M. Cappelletti, D. Lazzaro, I. Gloaguen, V. Poli, A. Sgura, D. Cimini, G. Ciliberto, R. Cortese, E. Fattori, N. La Monica (1999). Development of animal models for adeno-associated virus site-specific integration. *J Virol*. **73**, 2517-26.

Romano, G., C. Pacilio, A. Giordano (1999). Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells*. **17**, 191-202.

Russell, D. W., R. K. Hirata (1998). Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet*. **18**, 325-30.

Russell, D. W., A. D. Miller, I. E. Alexander (1994). Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 8915-19.

Russell, D. W. (2003). AAV loves an active genome. *Nat Genet*. **34**, 241-2.

Saeki, Y., T. Ichikawa, A. Saeki, E. A. Chiocca, K. Tobler, M. Ackermann, X. O. Breakefield, C. Fraefel (1998). Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of Replication-competent virus progeny and packaging of ampiklon vectors. *Hum Gene Ther*. **9**, 2787-94.

Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y..

Samulski, R. J., X. Zhu, X. Xiao, J. D. Brook, D. E. Housman, N. Epstein, and L. A. Hunter (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J*. **10**, 3941-50.

Saudan, P., J. Vlach, P. Beard (2000). Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb. *Embo J*. **19**, 4351-61.

Schmidt, M., S. Afione, R. M. Kotin (2000). Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *J Virol*. **74**, 9441-50.

Schroder, A.R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J.R. Ecker, F. Bushman (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. **110**, 521-29.

Shayakhmetov, D. M., C. A. Carlson, H. Stecher, Q. Li, G. Stamatoyannopoulos, and A. Lieber (2002). A high capacity, capsid-modified hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector for stable transduction of human hematopoietic cells. *Virol.* **76**, 1135-43.

Shelling, A. N., M. G. Smith (1994). Targeted integration of transfected and infected adeno-associated virus vectors containing the neomycin resistance gene. *Gene Ther.* **1**, 165-9.

Smith, A. E. (1997). Viral vectors in gene therapy. *Annual Review of Microbiology.* **49**, 807-38.

Smith, I. L., M. A. Hardwicke, R. M. Sandri-Goldin (1992). Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP 27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. *Virol.* **186**, 74-86.

Snyder, R. O., C. H. Miao, G. A. Patijn, S. K. Spratt, O. Danos, D. Nagy, A. M. Gown, B. Winther, L. Meuse, L. K. Cohen, A. R. Thompson, M. A. Kay (1997). Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nature Genetics.* **16**, 270-6.

Spaete, R. R., and N. Frenkel (1982). The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. *Cell.* **30**, 295-304.

Sun, X. J., F. Wang, M. Q. Tan, G. X. Lu (2006). Transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus 2 in human bone marrow CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells and mesenchyme stem cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* **31**, 19-23.

Surosky, R. T., M. Urabe, S. G. Godwin, S. McQuiston, G. J. Kurtzman, K. Ozawa, G. Natsoulis (1997). Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol.* **71**, 7951-9.

Suter, M., A. M. Lew, P. Grob, G. J. Adema, M. Ackermann, K. Shortman, C. Fraefel (1999). BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: a bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 12697-702.

Stavropoulos, T. A., and C. A. Strathdee (1998). An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J Virol.* **72**, 7137-43.

- Takenaka, T., C. S. Hendrickson, D. M. Tworek, M. Tudor, R. Schiffmann, R. O. Brady, and J. A. Medin** (1999). Enzymatic and functional correction along with long-term enzyme secretion from transduced bone marrow hematopoietic stem/progenitor and stromal cells derived from patients with Fabry disease. *Exp Hematol.* **27**, 1149-59.
- Thomas C. E., A. Ehrhardt, M. A. Kay** (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* **4**, 346-58.
- Thomassen, A., A. Zibert, H. Quang, L. Glouchkova, and D. Dilloo** (2001). A new generation of HSV BAC vectors for pReparation of leukemia vaccines. *Blood.* **98**, 695a.
- To, L. B., D. N. Haylock, P. J. Simmons, and C. A. Juttner** (1997). The biological and clinical uses of blood stem cells. *Blood.* **89**, 2233-58.
- Tolba, K. A., W. J. Bowers, S. P. Hilchey, M. W. Halterman, D. F. Howard, R. E. Giuliano, H. J. Federoff, and J. D. Rosenblatt** (2001). Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **98**, 287-95.
- Tsunoda, H., T. Hayakawa, N. Sakuragawa, H. Koyama** (2000). Site-specific integration of adeno-associated virus-based plasmid vectors in lipofected HeLa cells. *Viol.* **268**, 391-401.
- Van Damme, A., T. Vanden Driessche, D. Collen, and M. K. Chuah** (2002). Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther.* **2**, 195-209.
- Verma, I. M., N. Somia** (1997). Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature.* **389**, 239-42.
- Wagner, J. A., T. Reynolds, M. L. Moran, R. B. Moss, J. J. Wine, T. R. Flotte, P. Gardner** (1998). Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus (letter). *Lancet.* **351**, 1702-3.
- Walsh, C. E., A. W. Nienhuis, R. J. Samulski, M. G. Brown, J. L. Miller, N. S. Young, J. M. Liu** (1994). Phenotypic correction of Fanconi anemia in human hematopoietic cells with a recombinant adeno-associated virus vector. *J Clin Invest.* **94**, 1440-8.
- Wang, Y., S. M. Camp, M. Niwano, X. Shen, J. C. Bakowska, X. O. Breakefield, and P. D. Allen** (2002). Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus Rep(+) hybrid amplicon vector improves the stability of transgene expression in human cells by site-specific integration. *J Virol.* **76**, 7150-62.

- Wang, Y., S. Mukherjee, C. Fraefel, X. O. Breakefield, P. D. Allen** (2002): Herpes simplex virus type 1 amplicon vector-mediated gene transfer to muscle. *Hum Gene Ther.* **13**, 261-73.
- Ward, P. L., B. Roizman** (1994). Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen [published erratum appears in *Trends Genet.* 1994 Oct;10 (10): 380]. *Trends Genet.* **10**, 267-74.
- Wu, X., Y. Li, B. Crise, S. M. Burgess** (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science.* **300**, 1749-51.
- Yang, C. C., X. Xiao, X. Zhu, D. C. Ansardi, N. D. Epstein, M. R. Frey, A. G. Matera, and R. J. Samulski** (1997). Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol.* **71**, 9231-47.
- Young, S. M., Jr., D. M. McCarty, N. Degtyareva, and R. J. Samulski** (2000). Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J Virol.* **74**, 3953-66.
- Young, S. M., Jr., and R. J. Samulski** (2001). Adeno-associated virus (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 13525-30.
- Zhong L, Li W, Li Y, Zhao W, Wu J, Li B, Maina N, Bischof D, Qing K, Weigel-Kelle KA, Zolotukhin I, Warrington KH Jr, Li X, Slayton WB, Yoder MC, Srivastava A** (2006). Evaluation of primitive murine hematopoietic stem and progenitor cell transduction in vitro and in vivo by recombinant adeno-associated virus vector serotypes 1 through 5. *Hum Gene Ther.J.* **17**, 321-33.
- Zhou, S. Z., H. E. Broxmeyer, S. Cooper, M. A. Harrington, A. Srivastava** (1993). Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in murine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* **21**, 928-33.
- Zhou, S. Z., S. Cooper, L. Y. Kang, L. Ruggieri, S. Heimfeld, A. Srivastava, H. E. Broxmeyer** (1994). Adeno-associated virus 2-mediated high efficiency gene transfer into immature and mature subsets of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood. *J Exp Med.* **179**, 1867-75.
- Zibert, A., L. Müller, L. Nguyen, C. Krüsemann, D. Dilloo, and M. Roskrow** (1999). Replication-defective HSV amplicons for high efficiency gene-transfer into hematopoietic cells of different lineages. *Blood.* **94**, 180a.

Zibert, A., L. Müller, A. Thomassen, L. Nguyen, L. Glouchkova, C. Fraefel, M. Roskrow, and D. Dilloo (submitted). Herpes simplex virus type-1 amplicon vectors for generation of acute lymphoblastic leukemia vaccines.

Zibert, A., C. Paris-Scholz, L. Glouchkova, B. Ackermann, M. Roskrow, and D. Dilloo (2000). Leukemia cells transduced with HSV-1 amplicons expressing CD70 and IL-2 stimulate a protective anti-leukemic immune response. *Blood*. **96**, 804a.

Zibert, A., A. Thomassen, B. Ackermann, L. Müller, and D. Dilloo (2001). Human dendritic cells can be effectively transduced by new generation helper virus-free herpes simplex amplicon vectors. *Blood*. **98**, 423a.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin (Desoxyribonukleotid)
Abb.	Abbildung
AAV	adeno-assoziiertes Virus
AAVS1-site	adeno-assoziierte Virus Stelle 1 auf dem humanen Chromosom 19
amp ^r	Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAC	Bakterielles artifizielles Chromosom
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalzium ²⁺
cDNA	komplementäre DNA zur mRNA, copy-DNA
colE1	bakterielle Sequenz des Replikationsursprungs
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	counts per minute, Zerfälle pro Minute
CsCl	chemische Formel für Cäsiumchlorid
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s MEM
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
Exp.	Experiment
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FGF	Fibroblasten Wachsumsfaktor (engl. Abkürzung)

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (grün fluoreszierender Farbstoff)
FKS	fetales Kälberserum
flt-3	Rezeptor für einen Wachstumsfaktor
FL1-Detektor	Detektor für grüne Fluoreszenzfarbstoffe
FL2-Detektor	Detektor für rote Fluoreszenzfarbstoffe
FL3-Detektor	Detektor für dunkelrote Fluoreszenzfarbstoffe
FSC	forward light scatter, Vorwärtsstreulicht
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
G418	Geneticin 418
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution, ausgeglichene Salzlösung
HSV	Herpes simplex Virus
Hve	Herpes Virus Entry-Rezeptoren
IE 2	immediate early protein 2
IgG1	Immunglobulin G1
IL-3	Interleucin-3
ITR	inverted terminal repeat
Jur	Jurkat
Kb	Kilobasen
KE	Klonierungseffizienz
L	Liter
M	Mol
Mg ²⁺	Magnesium ²⁺
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	millimolar
MOPS	3-Morpholino-Ethansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
MSZ	mesenchymale Stammzellen
n	Anzahl
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NaP _i	Natrium-Phosphat-Puffer, Na ₂ HPO ₄ oder NaH ₂ PO ₄
ng	Nanogramm
n.K.	nach der Klonierung
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ori s	Replikationsursprung
p	Plasmid
P _i	Phosphat
pac	Verpackungssignal
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-chain-reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin (rot fluoreszierender Farbstoff)
pH	pH-Wert
PI	Propidiumiodid (rot fluoreszierender Farbstoff)
p5IEE	Rep-Promotor p5 (Integration Effizienz Element)
RBE	Rep binding element, Rep-bindendes Element
rc	relaxed circle
RELp	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
Rep	Regulatorprotein

RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RNase freie DNase I	Ribonuklease freie Desoxyribonuklease I
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
sc	supercoiled
SCF	Stammzellfaktor, pluripotenter Wachstumsfaktor
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
sek.	Sekunde
SSC	sideward light scatter, Seitwärtsstreulicht
T	Thymin
T _A	Annealing Temperature
Tab.	Tabelle
TE	Transgenexpression
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
<i>trs</i>	terminal resolution site (Ort der terminalen Spaltung durch Rep)
U	enzymatische Einheit („units“)
üN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

°C

Grad Celsius

Danksagung

Allen sei vielmals gedankt, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich Frau PD Dr. Dagmar Dilloo für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit der Nutzung von Labor und Arbeitsmitteln, ihre fachliche Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen guten Denkanstöße.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Thiel danke ich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen und für die zügige Begutachtung dieser Doktorarbeit.

Allen Mitarbeitern des KMT-Labors der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für das hervorragende Arbeitsklima, insbesondere Dr. Andree Zibert und Dr. Hülya Bülle für ihre sowohl moralische-, als auch fachliche Unterstützung.

Bei David Klostermann und Dr. Oliver Feyen möchte ich mich zusätzlich für ihre Hilfeleistungen bei meinen häufig vorgekommenen Computerproblemen bedanken.

PD Dr. Cornel Fraefel, Dr. Okay Saydam und Irma Heid danke ich für die fachliche Einarbeitung in die Thematik der Herstellung von HSV-1-Amplikonvektoren und die wunderschöne Zeit in Zürich.

Bei Dr. Sepideh Fanaei und Dr. Bertram Opalka möchte ich mich für die Hilfestellungen bei der Durchführung und Auswertung der Southern Blot-Analyse bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich stets unterstützt haben und meinem Bruder Stefan, der immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Meinem Mann Stephan möchte ich für seine seelische Unterstützung und in besonderem Maße für seine Geduld danken, die öfter auf das äußerste strapaziert wurde.

Dank natürlich auch an meinen Sohn Jannik, der es immer geschafft hat, mich mit seinem strahlenden Kinderlächeln auch in stressigen Situationen aufzumuntern.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten“

Issum, Februar 2007

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5188-2



9 783835 195188 4